Aus der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. Dr. h. c. H. E. Bock

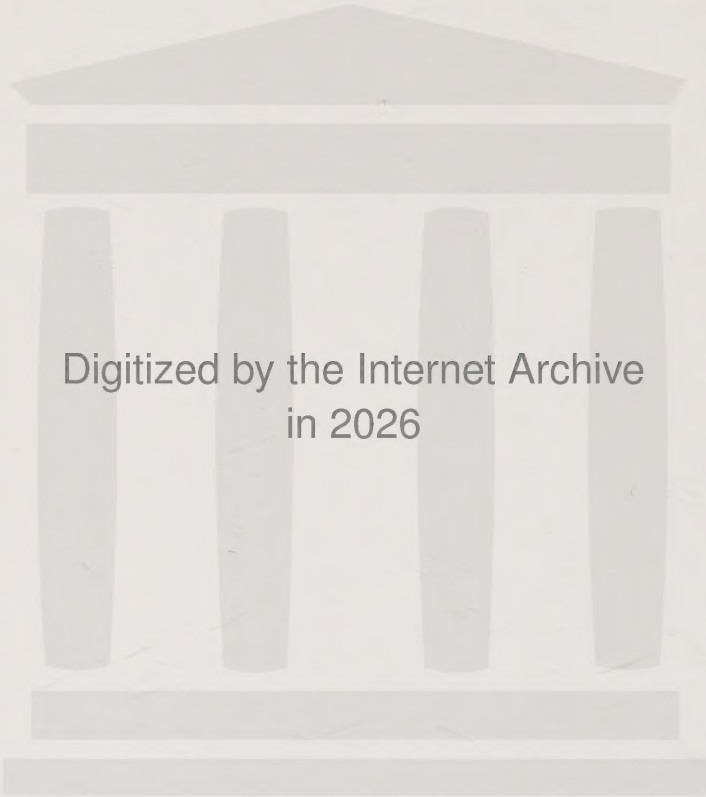
Zur Frage einer Wechselwirkung zwischen Insulin und dem Alpha-2 Makroglobulin des Humanserums

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Klinische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Hanskarl Dürr
aus Chemnitz

1970


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547603_0068

Aus der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. Dr. h. c. H. E. Bock

Zur Frage einer Wechselwirkung zwischen Insulin und dem Alpha-2 Makroglobulin des Humanserums

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Klinische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Hanskarl Dürr
aus Chemnitz

1970

Die Arbeit wurde mit Unterstützung der
Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt

Gedruckt mit Unterstützung des
Kultusministeriums Baden-Württemberg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan:

1. Berichterstatter: Professor Dr. E. Kallee
(Professor Dr. Dr. h.c. H.E. Bock)
2. Berichterstatter: Professor Dr. Dr. G. Weitzel

FOTODRUCK PRÄZIS Barbara v.Spangenberg KG · Tübingen

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	S. 1
2.	Allgemeines zum experimentellen Teil	S. 3
3.	Isolierung der γ-Globuline aus dem Immunserum	S. 4
3.1.	Materialien	S. 4
3.2.	Methode	S. 5
4.	Eichung der Antikörperlösungen und Bestimmung des α2M-Gehalts verschiedener Seren ..	S. 6
4.1.	Allgemeines	S. 6
4.2.	Proteinbestimmung nach HEINZEL	S. 7
4.2.1.	Materialien	S. 7
4.2.2.	Arbeitsgang bei der Proteinbestimmung nach HEINZEL	S. 8
4.2.3.	Leistungsfähigkeit der Proteinbestimmung nach HEINZEL	S. 10
4.3.	Die HEIDELBERGER-Methode	S. 11
4.3.1.	Allgemeines zur HEIDELBERGER-Methode ..	S. 11
4.3.2.	Materialien	S. 12
4.3.3.	Arbeitsgang bei der Messung des α2M-gehalts nach HEIDELBERGER	S. 13
4.3.4.	Leistungsfähigkeit der α2M-Bestimmung nach HEIDELBERGER	S. 15
4.3.4.1.	Das Fehlerrisiko bei der Proteinbestimmung	S. 15
4.3.4.2.	Das Fehlerrisiko bei der Festlegung des Äquivalenzpunktes	S. 16
4.3.4.3.	Die Auswirkung von Verdünnungstechnik und Inkubationsbedingungen auf das Fehlerrisiko	S. 18
4.4.	Eichung der Antikörperlösungen	S. 22

4.5. α2M-Gehalt von Normalserum ..... S. 23
4.6. α2M-Gehalt von Patientenseren ..... S. 26

5. Untersuchung der Bindung von Insulin an α2M S. 35
5.1. Materialien ..... S. 35
5.2. Methode ..... S. 35
5.2.1. Allgemeines zur Methode ..... S. 35
5.2.2. Wahl des Verhältnisses Antigen zu Antikörper ..... S. 36
5.2.3. Einfluß der Antikörperkonzentration auf die Meßgenauigkeit ..... S. 36
5.2.4. Die Bedeutung des Waschprozesses ..... S. 39
5.2.5. Messung der im immunologischen Präzipitat enthaltenen Insulinmenge ..... S. 41
5.2.6. Leistungsfähigkeit der Methode ..... S. 42
5.3. Bindung von Insulin durch α2M in Normalserum ..... S. 42
5.3.1. Einfluß der Inkubationstemperatur auf die Bindung ..... S. 42
5.3.2. Einfluß der Inkubationsdauer auf die Bindung ..... S. 44
5.3.3. Einfluß der Insulinkonzentration auf die Bindung ..... S. 47
5.3.4. Einfluß der α2M-Konzentration auf die Bindung ..... S. 48
5.4. Bindung von Insulin durch α2M in verschiedenen Patientenseren ..... S. 50
5.5. Bindung von Insulin an gereinigtes α2M .. S. 53

6. Insulinabbau durch gereinigtes α2M ..... S. 57
6.1. Materialien ..... S. 57
6.2. Methode ..... S. 57
6.3. Ergebnisse ..... S. 59
6.3.1. Zeitabhängigkeit der Insulinspaltung .. S. 59
6.3.2. Temperaturabhängigkeit der Insulinspaltung ..... S. 60

6.3.3. Abhängigkeit der Insulinspaltung durch gereinigtes α2M von der Insulinkonzentration ..... S. 61

6.3.4. Abhängigkeit der Insulinspaltung von der α2M-Konzentration ..... S. 65

6.3.5. Insulinspaltung in Gegenwart von Cialit S. 66

6.3.6. Hemmung der Insulinspaltung durch Albumin ..... S. 67

7. Diskussion ..... S. 69

7.1. Übersicht über die Literatur zu der Frage, in welcher Form das Insulin im Blut kreist ..... S. 69

7.1.1. Allgemeines ; Begriffe und Definitionen S. 69

7.1.2. Die Natur des endogenen nicht-immunreaktiven Insulins ..... S. 71

7.1.3. Das Schicksal exogenen, dem Serum zugefügten Insulins ..... S. 73

7.1.3.1. Allgemeines ..... S. 73

7.1.3.2. Elektrophoretische Untersuchungen ... S. 74

7.1.3.3. Untersuchungen mit Ultrazentrifuge und Gelfiltration ..... S. 76

7.1.3.4. Untersuchungen mit der Immunpräzipitation ..... S. 79

7.1.3.5. Untersuchungen mit gereinigtem α2M .. S. 80

7.2. Eigene Ergebnisse ..... S. 81

7.2.1. Insulinbindung durch α2M in Normalserum S. 81

7.2.2. Bindung von Insulin durch α2M in Patientenseren ..... S. 84

7.2.3. Bindung von Insulin durch gereinigtes α2M ..... S. 85

7.2.4. Insulinspaltung durch gereinigtes α2M . S. 86

7.3. Die Bedeutung der Befunde im Hinblick auf die Verhältnisse in vivo ..... S. 88

Zusammenfassung

Literaturverzeichnis

1. Einleitung

Das Alpha-2 Makroglobulin des Humanserums (= α2M) wurde zuerst von BROWN et al.(1954) und SCHULTZE et al.(1955) isoliert und von SCHÖNENBERGER et al. (1958) näher beschrieben. Auch einige andere Autoren beschäftigten sich wenig später mit diesem Glykoprotein, das in diesen Arbeiten zum Teil noch nicht die Bezeichnung "Alpha-2 Makroglobulin" trägt (MÜLLER-EBERHARD und KUNKEL 1956 ; MÜLLER-EBERHARD et al.1956 ; WALLENIUS et al.1957). Lange Zeit blieb das α2M eine schwer zugängliche Substanz. Erst vor wenigen Jahren wurden Verfahren angegeben, die seine Isolierung in größerem Maßstab ermöglichen (FILITTI-WURMSER und HARTMANN 1962a ; NORBERG 1964 ; STEINBUCH et al.1965 ; DUNN und SPIRO 1967a; RAZAFIMAHALEO und BOURRILLON 1968). Die Arbeiten zur Strukturaufklärung des α2M sind noch nicht abgeschlossen (FILITTI-WURMSER und HARTMANN 1962b ; NORBERG 1964 ; GANROT und LAURELL 1966 ; SVEHAG et al.1967 ; DUNN und SPIRO 1967b ; SANDERS und OTT 1968 ; GENTOU 1968 ; BOURRILLON et al.1968). Auch die dem α2M entsprechenden Proteine aus dem Serum verschiedener Tierarten wurden in den letzten Jahren untersucht (JACQUOT-ARMAND et al.1962 ; BOFFA et al.1964 ; BOFFA et al.1965a ; BOFFA et al.1965b; DEMAILLE et al.1965 ; GOT et al.1965 ; GOT et al. 1967 ; JACQUOT-ARMAND et al. 1965 ; MOURAY et al. 1965 ; JACQUOT-ARMAND und GUINAND 1967 ; GANROT 1968 ; HOUSLEY et al.1968 ; KNIGHT und DRAY 1968).

Besonderes Interesse gilt dem α2M, seitdem seine Bindungsfähigkeit für bestimmte Enzyme bekannt ist. Zuerst wurde das an Trypsin und Chymotrypsin erkannt (HAVERBACK et al.1962 ; SCHULTZE et al.1963 ; MEHL et al.1964 ; GANROT 1966a ; GANROT 1966b ; HOWARD 1966 ; JAMES et al.1966 ; MEHL et al.1966 ; MICHALSKI et al.1966 ; GANROT 1967a ; JACQUOT - ARMAND 1967 ; JAMES et al.1967 ; BIETH et al.1968 ; BOYDE und PRYME 1968 ; STEINBUCH et al.1968a). Sehr bald wurden noch weitere Enzyme gefunden, die vom α2M gebunden werden: Thrombin (LANCHANTIN et al. 1966 ; JAMES et al,1967 ; STEINBUCH et al.1967 ; STEINBUCH et al.1968b ; SZCZEKLIK 1969), Plasmin (SCHULTZE et al.1963 ; LAURITSEN 1966 ; RIMON et al. 1966 ; GANROT 1967b ; JAMES et al.1967 ; GANS und TAN 1967 ; STEINBUCH et al.1968a), Elastase (HEIMBURGER und HAUPT 1966), Kallikrein (DYCE et al.1967), Papain und Asparagin-Aminotransferase (BOYDE und PRYME 1968). Vergleiche dazu auch VOGEL und TRAUTSCHOLD (1966), SCHWICK et al. (1966) und GANROT (1967a).

Die Bindungsfähigkeit des α2M erstreckt sich aber nicht nur auf Enzyme, sondern auch auf zwei Proteohormone: Wachstumshormon (COLLIPP et al.1964 ; HADDEN und PROUT 1964) und Insulin (Literaturangaben in der Diskussion). Während jedoch die Bindungsfähigkeit des α2M für Enzyme als gesicherte Tatsache angesehen werden kann, besteht keine Einigkeit über die Deutung der Befunde, die zur Annahme einer Wechselwirkung zwischen α2M und insbesondere Insulin führten.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, unter Verwendung möglichst schonender und "physiologischer" Methoden einen Beitrag zur Klärung dieses Problems zu liefern.

2. Allgemeines zum experimentellen Teil

Der Versuch, die Insulinbindungskapazität des α2M zu messen, erfolgte in Anlehnung an die von KALLEE et al.(1963a) angegebene immunologische Methode:

Das Reinprotein oder das Serum wird mit Insulin inkubiert und anschließend das α2M durch einen spezifischen Antikörper ausgefällt. Die im Präzipitat enthaltene Insulinmenge wird gemessen. Als Antikörper verwendet man dabei nicht Vollserum, sondern reines, aus dem antikörperhaltigen Serum isoliertes γ-Globulin. Auf diese Weise läßt sich die Adsorption an systemfremde Proteine vermeiden.

Vorbedingung für die Anwendbarkeit der Methode ist, daß der Antigen- und Antikörpergehalt der verwendeten Seren und Lösungen bekannt ist. Andernfalls läuft man Gefahr, zu wenig Antikörper hinzuzufügen. Im Reaktionsgemisch würde dann ein Antigenüberschuß vorliegen, was die Bildung löslicher Antigen-Antikörperkomplexe zur Folge hätte (vgl. KABAT und MAYER 1962). Vor den eigentlichen Bindungsmessungen

muß also der Titer der Antikörperlösung und der α2M-Gehalt der untersuchten Seren bestimmt werden.

Das methodische Vorgehen gliedert sich demgemäß in folgende Stufen:

a) Isolierung der γ-Globuline aus dem Immunserum ;
b) Bestimmung von Antigen- und Antikörpergehalt der untersuchten Lösungen und Seren ;
c) Untersuchung der Bindung von Insulin an das α2M.

In einem letzten Abschnitt schließlich wird die Untersuchung des Insulinabbaues durch ein gereinigtes α2M-Präparat beschrieben.

3. Isolierung der γ-Globuline aus dem Immunserum

3.1. Materialien

Anti-Human-α2M-Vollserum (Behringwerke, Marburg)

Es handelt sich um Immunseren vom Kaninchen. Verwendet wurden drei Chargen (op.870, op.976 und op.1044).

Gesättigte Ammoniumsulfatlösung

In heißem destillierten Wasser wurde so viel Ammoniumsulfat "für biochemische Zwecke" (Merck) gelöst, daß bei wochenlangem Stehen bei Zimmer-

temperatur stets ein Bodensatz sichtbar blieb.

Dialysierschläuche (Kalle & Co., Wiesbaden)

Cellophan^{R}-Schläuche von 25 mm Durchmesser.

Rivanol ^{R} (Farbwerke Hoechst)

Es handelt sich um 2-Äthoxy-6,9-diamino-acridin-DL-lactat.

Cialit ^{R} (Asid, München)

Es handelt sich um 2-(Aethyl-mercuri-mercapto)-benzoxazol-5-carbonsaures Natrium

3.2. Methode

Die γ-Globuline wurden genau nach dem von KALLEE et al.(1963a) angegebenen Verfahren isoliert :

A. Zunächst wird eine sechsfach fraktionierte Fällung mit der gesättigten Ammoniumsulfatlösung durchgeführt nach folgendem Schema:

Fällung Nr.1: 140ml Serum plus 140ml ges. Ammoniumsulfatlsg.(=AS)

Fällung Nr.	Niederschlag der jeweils vorhergegangenen Fällung gelöst in ml H_2O	ml AS zugefügt	(=AS-Sättigung)
2	20	15	ca.43%
3	21	14	ca.40%
4	22	12	ca.35%
5	24	12	ca.33%
6	22	11	ca.33%

B. Die 33%-AS-Niederschläge werden durch Dialyse gegen eine wässrige Lösung von 0,09%NaCl, 0,01% $HaHCO_3$ und 0,01% Cialit vom AS befreit. Zu 5 Volumteilen der erhaltenen trüben Lösung wird ein Volumteil einer frisch bereiteten Lösung von 1g Rivanol in 25ml Wasser zugefügt.

C. Der Überstand enthält die γ-Globuline. Das ebenfalls noch enthaltene Rivanol wird ausgefällt, indem man zu je fünf Volumteilen des Überstands ein Volumteil einer 30%igen NaCl-lösung gibt. Restliche Rivanolspuren werden gegen 0,08% NaCl herausdialysiert.

D. Die dialysierte γ-Globulinlösung wird lyophilisiert. Die Trockensubstanz wird in so viel Wasser gelöst, daß die Endkonzentration an NaCl etwa 0,9% beträgt. Die noch trübe Lösung wird zentrifugiert. Der klare Überstand wird mit HCl und NaOH nach der von KALLEE et al. (1963b) angegebenen Methode auf einen stabilen pH-Wert von 7,35 eingestellt und nach Abfüllen in Portionen von je 1 ml eingefroren.

4. Eichung der Antikörperlösungen und Bestimmung des α2M-Gehalts verschiedener Seren

4.1. Allgemeines

Der α2M-Gehalt der verschiedenen Seren wurde mit der von HEIDELBERGER angegebenen Methode bestimmt (Einzelheiten s. bei Abschnitt 4.3.). Einer der wichtigsten Arbeitsgänge dabei ist die Messung

des Proteingehaltes der immunologischen Präzipitate. In der vorliegenden Arbeit diente hierfür die von HEINZEL (1960) angegebene Methode.

4.2. Proteinbestimmung nach HEINZEL et al.(1965)

4.2.1. Materialien

Träger aus Polyesterfasern (Macherey, Nagel & Co.)

Kunststoffpapier MN52K/606 in Streifen (20x400 mm).

Lösung I

0,5ml Ölsäure in 100ml Äther. Die Polyesterstreifen werden vor Gebrauch mit dieser Lösung getränkt. Es wirkt sich günstig aus, wenn man sie bis zur Weiterverwendung mindestens eine Woche an der Luft liegen läßt.

Lösung II

1,0g Amidoschwarz 10B (Merck)
1,0g Oxalsäure
100ml Methanol
Ein Teil der Oxalsäure bleibt ungelöst.

Lösung III

0,3g Amidoschwarz in 100ml Methanol

Lösung IV

4ml Eisessig in 100 ml Methanol

Lösung V

100 Teile Lösung IV + 2 Teile Lösung III

Lösung VI

100 Teile Lösung IV + 0,3 Teile Lösung III

Lösung VII

66 Teile Äther + 33 Teile Lösung IV

Lösung VIII

25 Teile gesättigte wässrige Na-oxalatlösung
75 Teile Methanol
Die milchige Trübung wird abgefiltert.

Lösung IX

3,9g Glycin + 3,04g NaCl + 48,1ml 1n HCl
H_2O ad 1000ml.

4.2.2. Arbeitsgang bei der Proteinbestimmung nach HEINZEL

Die Methode bedient sich des Phänomens, daß bestimmte Polyesterfasern die Fähigkeit haben, Proteine sehr fest zu binden. Bringt man Proteinlösungen auf Träger aus solchen Fasern auf, so kann man das Eiweiß färben, ohne daß die Bindung des Proteins an die Faser irgendwie beeinträchtigt wird. Die Menge des gebundenen Farbstoffs, der sich mit geeigneten Lösungsmitteln wieder herunterlösen läßt, ist ein direktes Maß für die auf dem Träger befindliche Proteinmenge.

Im einzelnen wird folgendermaßen gearbeitet:

1. Die immunologischen Präzipitate werden zweimal mit physiol. Kochsalzlösung gewaschen (die Menge der Waschflüssigkeit richtet sich nach der Präzipitatmenge) und dann in ca. 50 oder 100 ul Glycinpuffer (Lösung IX) gelöst. Diese Lösung wird mit Hilfe kapillar ausgezogener Glasröhrchen auf die Polyesterträger überführt. Die Gläschen werden zweimal mit Glycinpuffer nachgewaschen, und die Waschflüssigkeit wird ebenfalls auf die Träger gebracht.

2. Nach dem Trocknen werden die Träger 15 min in Lösung II gefärbt und dann, nach kurzem Baden in Lösung IV, weitere 20 min in Lösung V nachgefärbt. Dann werden die Träger zum Auswaschen nichtgebundenen Farbstoffs je drei- bis fünfmal in folgende Lösungen getaucht: a) Lösung VI, b) Lösung VII, c) Lösung VII, d) Äther, e) Äther.

3. Die Träger werden zerschnitten und die gefärbten Anteile mit genau abgemessenen Mengen (je 5 ml, wenn nicht anders angegeben) von Lösung VIII eluiert. In einem Photometer vom Typ MK 3 der Firma Robert Riele KG (Berlin) wird die Extinktion der Eluate gemessen. Wellenlänge des Filters: 620nm; Schichtdicke: 1 cm. Die gemessenen Extinktionswerte sind in den Diagrammen unter der Bezeichnung $\Delta E620$ eingetragen. Sie sind direkt proportional der Proteinmenge (Abb.1).

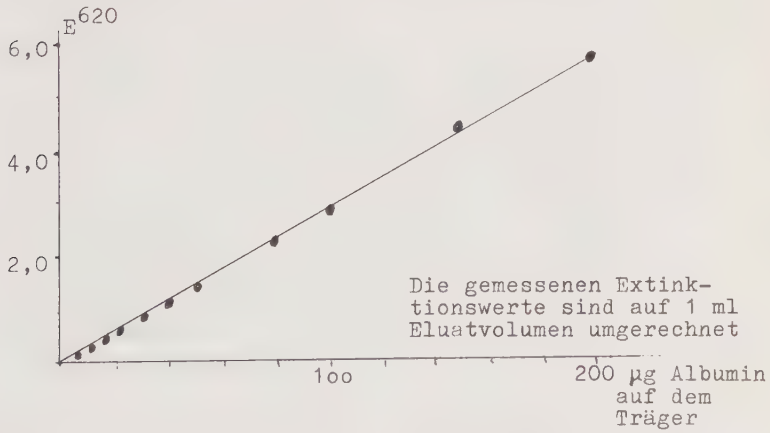


Abb.1 Proteinbestimmung nach HEINZEL (Prot.-Nr. H158)

4.2.3. Leistungsfähigkeit der Proteinbestimmung nach HEINZEL

Die Leistungsfähigkeit der Methode wurde in zwei Stufen überprüft:

1. Auf 12 Polyesterträger wurden je 25µl einer ca. 1%igen Albuminlösung aufgetragen. Die Streifen wurden wie beschrieben weiter verarbeitet. Die mittlere Schwankungsbreite der Extinktionswerte betrug $\sigma = \pm 1{,}5\%$. Hierin sind sämtliche Pipettierfehler enthalten, die beim Arbeiten mit Mikropipetten kaum unter 1% herabgedrückt werden können. Es folgt, daß die Arbeitsvorgänge der Farbstoffbindung und -elution kaum zum Fehler beitragen.

2. Es wurde eine Stammlösung hergestellt, die pro Milliliter 0,25mg Albumin und 0,078µg 131J-markiertes Insulin enthielt (H157). Davon wurden in 16 Spitzgläser je 100µl einpipettiert. Die Zählung der Impulsraten ergab einen mittleren Pipettierfehler von $\sigma = \pm 1{,}5\%$. Dann wurde von einem Antialbuminserum mit bekanntem Titer so viel zugefügt, daß im Gemisch ein Antikörperüberschuß vorlag. Die Bedingungen waren so gewählt, daß Präzipitationsmengen und -bedingungen in einem günstigen Bereich lagen. Die Präzipitate wurden nach HEINZEL weiter verarbeitet. Die mittlere Schwankung der Extinktionswerte betrug hier $\sigma = \pm 5\%$. Durch den Vorgang der Präzipitation und die weitere Verarbeitung wird der Fehler also stark erhöht, nach AMBROSIUS und LEHMANN (1967) insbesondere durch das Waschen der Präzipitate.

4.3. Die HEIDELBERGER-Methode

4.3.1. Allgemeines zur HEIDELBERGER-Methode

Der Titer einer Antigen- oder Antikörper-haltigen Lösung kann bestimmt werden mit Hilfe der von HEIDELBERGER angegebenen Methode (vgl. KABAT und MAYER 1962): Beim Mischen eines Antigens mit dem entsprechenden präzipitierenden Antikörper bilden sich lösliche Komplexe, wenn das Antigen im Überschuß vorliegt. Durch Zugabe steigender Mengen von Antigen zu konstanten Mengen von Antikörper erhält man zunächst steigende Präzipitatmengen. In der sog. Äquivalenzzone erreichen diese ein Maximum und nehmen bei weiter steigender Antigenmenge wieder ab.

Aufgrund einer etwas vereinfachenden Modellvorstellung liegt in der Äquivalenzzone gerade die Menge an Antigen vor, die von der vorgegebenen konstanten Antikörpermenge gerade noch quantitativ präzipitiert werden kann. Es läßt sich also mit einer Antigenlösung von bekannter Konzentration der unbekannte Titer einer Antikörperlösung messen. Mit einer geeichten Antikörperlösung läßt sich in analogen Versuchsreihen der Antigengehalt anderer Testlösungen oder -seren bestimmen

4.3.2. Materialien

Mikrozentrifugengläser

Alle Ansätze wurden in kleinen Spitzgläsern (7mm lichte Weite; 40mm lang) durchgeführt.

Mikropipetten

Es wurden halbautomatische gläserne Mikropipetten der Fa. Pedersen (Kopenhagen) oder automatische Mikropipetten "System Marburg" der Fa. Netheler und Hinz (Hamburg-Eppendorf) verwendet.

Normalserum

Je etwa 10ml Blut von 15 normalen Blutspendern wurden ohne weitere Zusätze gemischt und einige Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Der Blutkuchen wurde dann abzentrifugiert und die leicht hämolytischen Seren nach der von KALLEE et al.(1963a) angegebenen Methode mit verdünnten Lösungen von HCl und NaOH auf einen stabilen pH-Wert von 7,37 eingestellt. Das Mischserum wurde in Portionen von 2ml eingefroren.

Patientenseren

Das Blut wurde aus einer Armvene entnommen, mehrere Stunden bei Zimmertemperatur aufbewahrt, abzentrifugiert und der Überstand eingefroren. Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte wie beim Normalserum beschrieben jeweils kurz vor Gebrauch der Seren, ausgenommen die Fälle, in denen die Seren nicht mit physiol. Kochsalzlösung, sondern mit Puffer verdünnt wurden.

Antikörperlösungen (vgl. dazu Abschnitt 3)

Es wurde mit den beiden Antikörperpräparaten op.870 und op.1044 gearbeitet. Das Präparat op. 870 enthielt gereinigtes Kaninchen-γ-Globulin in einer Konzentration von ca. 3,7g/100ml. Das Präparat op. 1044 enthielt gereinigtes Kaninchen-γ-Globulin in einer Konzentration von ca. 3,5g/100ml. Vor Gebrauch wurden beide Stammlösungen im allgemeinen mit physiol. Kochsalzlösung im Verhältnis 1:5 verdünnt (1 Teil Stammlösung plus 4 Teile Physiol. Kochsalzlösung).

α2M-Standardlösungen

Es wurden zwei verschiedene gereinigte α2M-Präparate der Behringwerke verwendet. Nach Angaben des Werkes sollten beide das Protein in einer Konzentration von 1g/100ml enthalten. Die Überprüfung dieser Angaben (Proteinbestimmung nach HEINZEL ; Auswertung mit Hilfe des von Dr. HEINZEL bestimmten Farbbindungskoeffizienten von α2M) ergab folgende Werte:
Präparat op. 151165: 0,9 g α2M/100ml
Präparat op. 1165: 1,6 g α2M/100ml.
Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte wie für Normalserum beschrieben.

4.3.3. Arbeitsgang bei der Messung des α2M-Gehalts nach HEIDELBERGER

Zur Veranschaulichung des methodischen Vorgehens wird im folgenden eine Versuchsreihe beschrieben, die typisch für alle anderen ist. Ihr Zweck war die Eichung der Antikörperlösung op.1044 mit Hilfe des α2M-Standards. Beim umgekehrten Fall, der Messung des α2M-Gehalts eines Testserums mit einem bereits geeichten Antikörper, wird genau in gleicher Weise verfahren. (Vergleiche dazu Abb.5).

Die α2M-Standardlösung op.151165 wurde, nach Einstellen ihres pH-Wertes auf 7,35, mit physiol. Kochsalzlösung auf die Hälfte verdünnt. Mit dieser Lösung wurde folgende Verdünnungsreihe angesetzt:

Glas Nr.	1	2	3	4	5	6	7
µl ∝2M 0,45%	70	60	50	40	30	20	10
µl phys. NaCl-lsg.	30	40	50	60	70	80	90
µg ∝2M im Ansatz	315	270	225	180	135	90	45

Dann wurden zu jedem Gläschen 200µl der Antikörperlösung gegeben (Stammlösung op.1044 1:5 verdünnt). Die Ansätze wurden mit einem fein ausgezogenen Glasstab gut durchgerührt und in den Kühlraum (4°) gestellt. Nach 48 Std. wurden die immunologischen Präzipitate 8 min lang bei 1770g abzentrifugiert, zweimal mit je 100µl physiol. Kochsalzlösung gewaschen und nach HEINZEL weiter verarbeitet. Zur Kontrolle wurde für jede Verdünnungsstufe ein doppelter Ansatz hergestellt.

Anmerkung zur Verdünnungsreihe:

Man kann das Antigen entweder im logarithmischen Maßstab oder arithmetisch verdünnen. Ersteres ist empfehlenswert, wenn keinerlei Hinweis auf den Titer der Lösung vorliegt. Eine logarithmische Verdünnungsreihe überstreicht mit wenigen Ansätzen einen breiten Konzentrationsbereich und ermöglicht daher rasch eine ungefähre Festlegung des gesuchten Titers. Will man aber ein genaueres Ergebnis haben, so ist eine arithmetische Verdünnungsreihe vorzuziehen.

4.3.4. Leistungsfähigkeit der α2M-Bestimmung nach HEIDELBERGER

4.3.4.1. Das Fehlerrisiko bei der Proteinbestimmung

Bei 47 Doppelbestimmungen von HEIDELBERGER-Kurven (also 94 Einzelkurven, von denen je zwei mit identischen Verdünnungsreihen identischer Seren und unter den gleichen Inkubationsbedingungen durchgeführt wurden) konnten insgesamt 440 Extinktionswerte gemessen werden. Diese lassen sich zu 220 Wertepaaren zusammenfassen, deren Einzelwerte unter idealen Bedingungen identisch sein sollten. Es ergibt sich jedoch, daß die Einzelwerte dieser Wertepaare um Null bis (in einem Extremfall) um 48 Prozent, im Durchschnitt um 6,4 Prozent von ihrem jeweiligen Mittelwert abweichen.

Wie auf S.10 angegeben ist, beträgt die mittlere Streubreite der Proteinbestimmungsmethode unter günstigen Bedingungen $\sigma = \pm 5\%$. Bei der hier beschriebenen Berechnung kommt ein schlechteres Ergebnis heraus, vermutlich deshalb, weil ein Teil der Meßwerte unter ungünstigen Bedingungen zustandegekommen ist: In die Rechnung sind ohne Ausnahme alle doppelt bestimmten Extinktionswerte der Kurven einbezogen, auch diejenigen, die im Bereich großen Antigen- oder Antikörperüberschusses, also teilweise mit sehr geringen Präzipitatmengen , gewonnen wurden.

4.3.4.2. Das Fehlerrisiko bei der Festlegung des Äquivalenzpunktes

Beim Ausmessen der unter 4.3.4.1. erwähnten 94 Einzelkurven ergab sich folgendes:

a) Bei 16 Kurvenpaaren wurde die Äquivalenzzone nicht erreicht, da alle Meßpunkte dieser Kurven im Antikörperüberschußbereich lagen.
b) Bei 22 Kurvenpaaren wurde die maximale Extinktion für beide Kurven jeweils bei ein und derselben Verdünnungsstufe gemessen.
c) Bei 3 Kurvenpaaren differierte die x-Koordinate der Meßpunkte mit maximaler Extinktion jeweils um eine Verdünnungsstufe.
d) 6 Kurvenpaare können nicht verwertet werden, weil ein oder mehrere Extinktionswerte so stark aus der Reihe fielen, daß aus unbekannten Gründen doppelgipfelige Kurven entstanden.

Nur die insgesamt 50 Einzelkurven der Gruppen b) und c) konnten bei dem Versuch verwendet werden, das Fehlerrisiko abzuschätzen, welches man bei der Festlegung des Äquivalenzpunktes der Kurven eingeht. Die 50 Kurven wurden einzeln und unabhängig voneinander aufgezeichnet, die Lage der Maxima graphisch bestimmt und dann jeweils die beiden zusammengehörigen Werte einander zugeordnet. Es ergeben sich 25 Wertepaare, deren Einzelwerte um Null bis (in einem Extremfall) um 15 Prozent, im Durchschnitt um 3,4 Prozent von ihrem jeweiligen Mittelwert abweichen.

Bei der Berechnung wurde nur solche Kurven miteinander verglichen, die mit identischen Verdünnungsreihen identischer Seren unter den gleichen Inkubationsbedingungen gewonnen wurden. Theoretisch ist die Lage des Äquivalenzbereichs einer HEIDELBERGER-Kurve in Bezug auf die x-Achse nur vom Antigen- und Antikörpergehalt der eingesetzten Lösungen abhängig, nicht dagegen von den Inkubationsbedingungen oder der Art der Verdünnungsreihe. Deswegen müssen bei der Abschätzung der Leistungsfähigkeit der Methode auch solche Kurven miteinander verglichen werden, bei denen die beiden letztgenannten Faktoren unterschiedlich waren.

Diese Art des Vergleichs wurde anhand von 67 Einzelkurven durchgeführt, die sich zu insgesamt 24 Gruppen zusammenfassen ließen (15 Gruppen zu je 2 Kurven, 3 Gruppen zu je 3 Kurven und 7 Gruppen zu je 4 Kurven). Die Einzelkurven innerhalb jeder Gruppe waren mit dem gleichen Antigen und identischen Mengen desselben Antikörperpräparats, teilweise aber mit unterschiedlichen Antigenverdünnungsstufen gewonnen worden. Die Inkubationsbedingungen waren ebenfalls teilweise unterschiedlich (innerhalb der einzelnen Gruppen). Wie schon auf S.16 beschrieben, wurden die Kurven unabhängigvoneinander aufgezeichnet, die Lage ihrer Maxima graphisch bestimmt und zusammengehörige Werte einander zugeordnet. Die Einzelwerte weichen dann um Null bis 23 Prozent, im Durchschnitt um 6,1% von ihrem jeweiligen Mittelwert ab.

4.3.4.3. Die Auswirkungen von Verdünnungstechnik und Inkubationsbedingungen auf das Fehlerrisiko

In Abschnitt 4.3.4.2. wurde bereits gezeigt, daß die Inkubationsbedingungen und die Art der Verdünnungsreihe des Antigens zwei Faktoren sind, die einen nicht unbeträchtlichen Einfluß auf das Fehlerrisiko der α2M-Bestimmung nach HEIDELBERGER ausüben.

Die Bedeutung der Verdünnungstechnik ergibt sich aus folgender Überlegung: Nur ausnahmsweise und durch Zufall wird die Verdünnungsreihe so gewählt sein, daß bei einer bestimmten Verdünnungsstufe genau die Menge an Antigen vorliegt, die der zugesetzten Menge von Antikörper äquivalent ist. Nur in solchen Ausnahmefällen ist der Meßpunkt mit dem höchsten Extinktionswert identisch mit dem wahren Äquivalenzpunkt. Normalerweise dagegen wird dieser irgendwo in der Nähe des genannten extremen Meßpunktes liegen, so daß eine gewisse Willkür bei der graphischen Festlegung des Kurvenmaximums unvermeidlich ist.

Diese Unsicherheit läßt sich verringern, wenn man die Meßpunkte enger legt. In den Abbildungen 2 und 3 werden zwei Beispiele dafür gezeigt.

Die Deutung der beiden Abbildungen wird etwas erschwert dadurch, daß die Inkubationszeiten der einzelnen Kurven nicht übereinstimmen. Dadurch kann

eine Vertikalverschiebung der Kurven eintreten, wie an Abb. 4 noch ausgeführt wird. Es ist aber bei beiden Abbildungen zu erkennen, daß der Äquivalenzpunkt viel schärfer zutage tritt, wenn die Meßpunkte enger gelegt werden. Außerdem sieht man, daß bei der Interpolation etwas verschiedene Kurvenformen herauskommen, je nachdem, wie viele Meßpunkte vorliegen. Der Vergleich von H68 mit H91 zeigt, daß es insbesondere im Bereich der stärksten Krümmung auf die Zahl der Meßpunkte ankommt. Liegen sie hier weit auseinander, so werden die Kurven im allgemeinen zu flach interpoliert.

Die Form der Kurven ist also eine Eigenschaft, aus der sich keine sicheren Schlüsse ziehen lassen. Die x-Koordinate der Kurvenmaxima, auf die allein es bei der HEIDELBERGER-Methode ankommt, bleibt dagegen erstaunlich konstant.

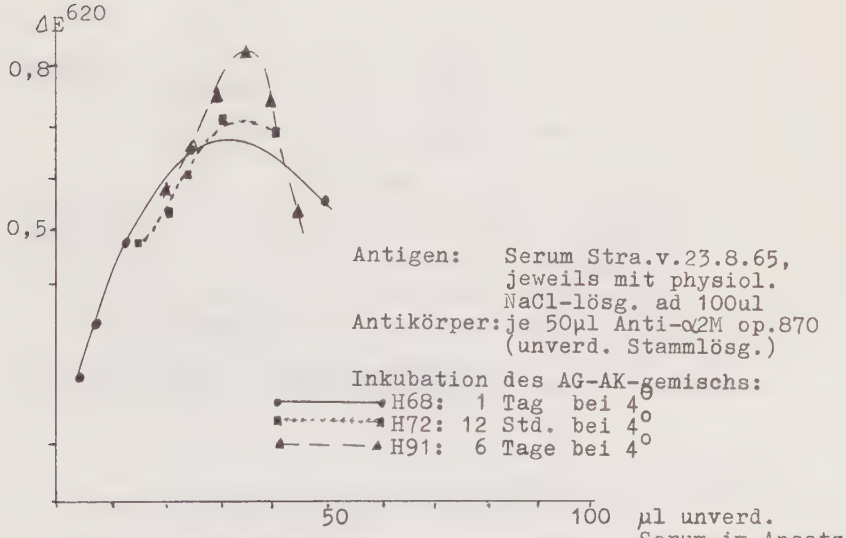


Abb.2 Einfluß der Verdünnungstechnik (Protokoll-Nummern: H68;H72;H91)

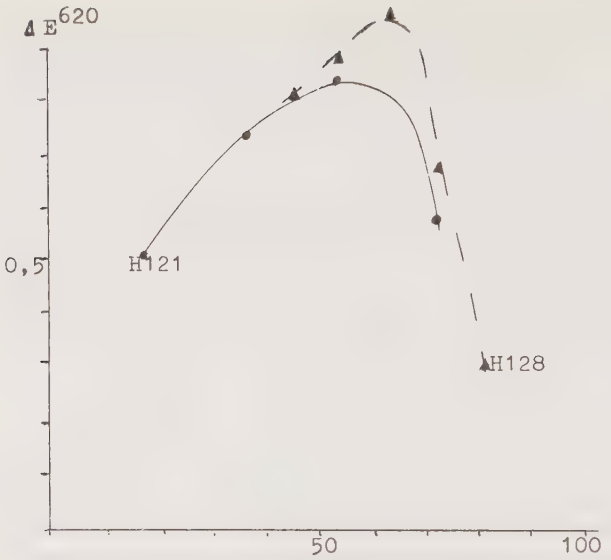


Abb.3 Einfluß der Verdünnungstechnik (Protokoll-Nummern: H121;H128)

Antigen: Serum Fri. vom 23.7.66, jeweils mit physiol. Kochsalzlösung ad 100µl

Antikörper: Je 200ul Anti-∝2M op.1044 (Stammlösung 1:5 verdünnt)

Die gestrichelte Kurve stellt jeweils die HEIDELBERGER-Kurve dar, die mit Hilfe des gleichen Antigens und des gleichen Antikörpers gewonnen wurde wie die ausgezogene. Jedoch betrug die Inkubationszeit bei der ausgezogenen Kurve 15 Std. und bei der gestrichelten Kurve 30 Std. Inkubationstemperatur in beiden Fällen: 22°C. Die gestrichelte Kurve wurde 14 Tage nach der ausgezogenen aufgenommen. Serum und Antikörper wurden während dieser Zeit bei -20° aufbewahrt.

Ein Beispiel für den Einfluß unterschiedlicher Inkubationsbedingungen gibt Abb. 4. Man sieht, daß die längere Inkubationszeit eine Erhöhung der Präzipitatmenge zur Folge hat. Die Abbildung zeigt gleichzeitig, daß die Lage des Kurvenmaximums in Bezug auf die x-Achse nicht beeinflußt wird. Die Inkubationszeit ist also ein Faktor, der lediglich eine Vertikalverschiebung der Kurven hervorrufen kann. Möglicherweise spielt dabei eine Anlagerung von Komplement an das immunologische Präzipitat eine Rolle.

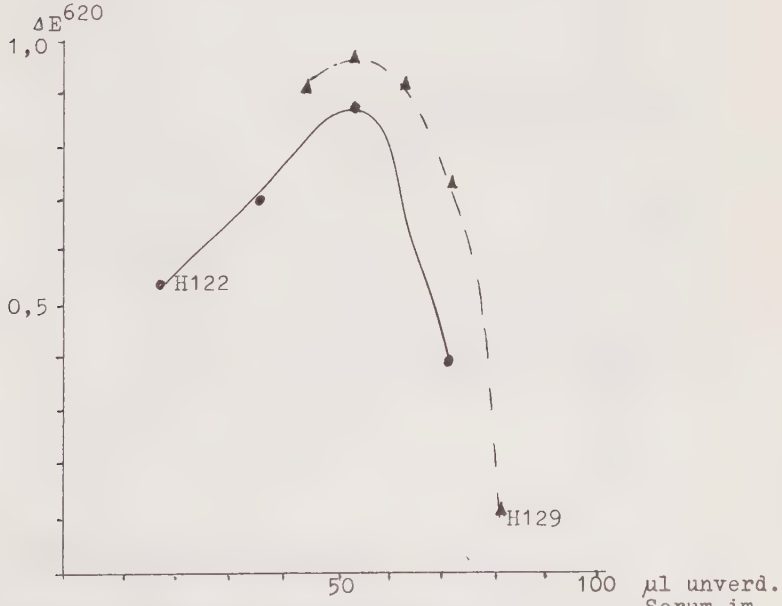


Abb.4 Einfluß unterschiedlicher Inkubationsbedingungen (Protokoll-Nummern: H122;H129)

Antigen: Serum Fri. vom 11.8.66

Antikörper und Inkubationsbedingungen für ausgezogene und gestrichelte Kurve wie in Abb.3

4.4. Eichung der Antikörperlösungen

In den Abbildungen 5 und 6 sind die Eichkurven für die beiden Antikörperpräparate op.1044 und op.870 dargestellt. Wie Abb.5 zeigt, vermögen 200µl der 1:5 verdünnten Stammlösung des Präparats op.1044 maximal 135µg a2M zu präzipitieren. Beim Präparat op.870 sind 50µl der unverdünnten Stammlösung erforderlich, um 135µg α2M zu präzipitieren (Abb.6).

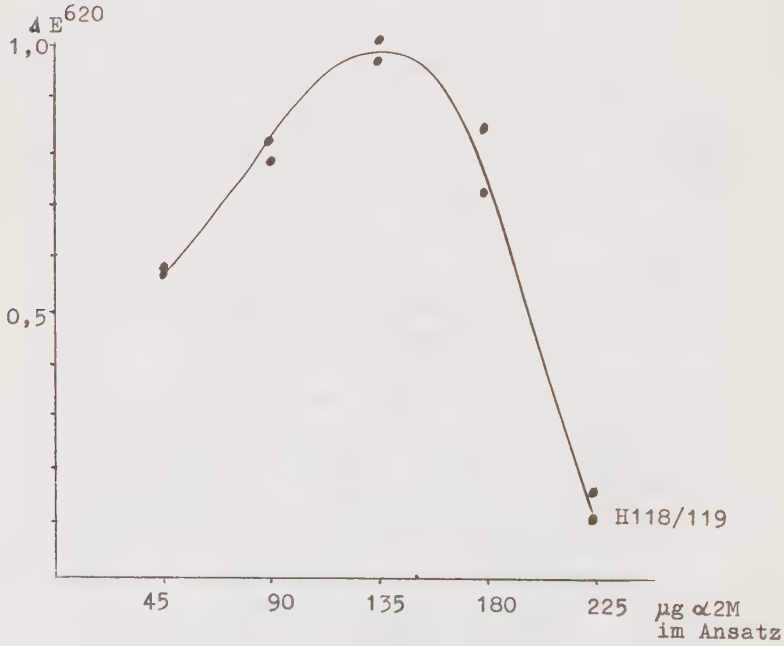


Abb.5 Eichung der Antikörperlösung op.1044 (Protokoll-Nr. H118/119)

Es handelt sich um die in Abschnitt 4.3.3. ausführlich beschriebene Versuchsreihe

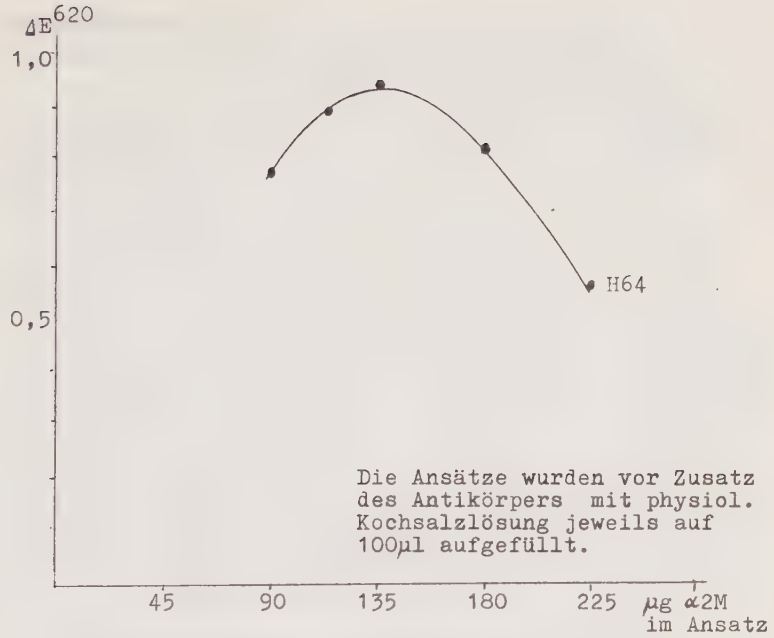


Abb.6 Eichung der Antikörperlösung op.870 (Protokoll-Nr. H64)

Antigen: α2M-Standard op.151165 (pH 7,35)
Antikörper: Je 50µl Anti-α2M op.870 (unverdünnte Stammlösung)
Inkubation des AG-AK-gemischs: 1 Tag bei 4°C

4.5. α2M-Gehalt von Normalserum

In Abb.7 ist die HEIDELBERGER-Kurve des Normalserums dargestellt. Der Äquivalenzpunkt liegt bei 60 µl unverdünntem Serum. Das bedeutet, daß 60µl des Serums 135µg α2M enthalten, nämlich gerade die Menge, die von der eingesetzten Antikörpermenge

maximal präzipitiert werden kann. Umgerechnet ergibt das einen α2M-Spiegel von 0,225 g/100ml.

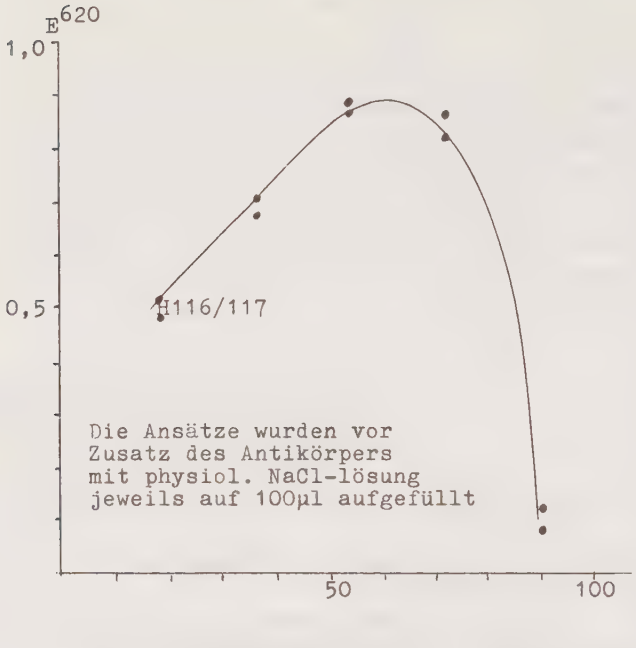


Abb.7 HEIDELBERGER-Kurve von Normalserum (Protokoll-Nr. H116/117)

Antigen: Normalserum (pH 7,37)
Antikörper: Je 200ul Anti-α2M op.1044 (Stammlöung 1:5 verdünnt)
Inkubation des AG-AK-gemischs: 30Std. bei 22°C

Die Angaben der Literatur über den α2M-Gehalt von Normalserum schwanken in weiten Grenzen, abhängig von der Untersuchungstechnik und insbesondere von der Art des α2M-Präparats, das zur Standardisierung verwendet wurde. Tabelle 1 gibt einen Überblick:

Tabelle 1

Autoren	Zahl der Untersuchten	α_{2M} (mg/100ml) Konzentration	Bereich
PETERKOFSKY et al.(1956)	5	220	160-265
SCHULTZE und SCHWICK (1959)	-	240	-
HITZIG (1961)	-	356±29	-
WEISS (1965)	30	292±98	-
JAMES et al. (1966)	33 männl. 22 weibl.	265±55 335±57	150-370 265-460
GANROT und SCHERSTEN(1967)	- männl. - weibl.	173 206	108-297 144-315
ADHAM et al. (1967)	30 männl. 30 weibl.	215±11 219±11	130-304 137-334
CLEVE (1968)	98	186±44	
STÖRIKO (1968)		240	130-280
KLUTHE et al. (1966)	6 männl.	275	220-325

In den neueren Arbeiten werden die hohen Werte, die früher von HITZIG (1961), WEISS(1965) und JAMES et al.(1966) angegeben wurden, übereinstimmend nicht bestätigt. Der hier gefundene Wert von 225 mg/100ml befindet sich also in guter Übereinstimmung mit der Literatur.

4.6. α2M-Gehalt von Patientenseren

In den Abbildungen 8, 9 und 10 sind die HEIDELBERGER-Kurven von 11 verschiedenen Patienten (alles Diabetiker) dargestellt. Der Vergleich des α2M-Gehalts dieser Seren mit dem von Normalserum ergibt folgendes:

a) Bei 2 Seren ist der α2M-Spiegel normal (225 mg/100ml).

b) Bei 4 Seren ist der α2M-Spiegel leicht erhöht (245 mg/100ml).

c) Bei 2 Seren ist der α2M-Spiegel deutlich erhöht (270 mg/100ml und 300 mg/100ml).

d) Bei 3 Seren ist der α2M-Spiegel stark erhöht (390 mg/100ml) .

e) Bei einem Serum ist der α2M-Spiegel sehr stark erhöht (540 mg/100ml) .

In den Abbildungen 11, 12 und 13 sind die HEIDELBERGER-Kurven von Seren jeweils desselben Patienten dargestellt, die zu verschiedenen Zeitpunkten abgenommen wurden. Der durchschnittliche α2M-Spiegel ist:

a) Beim Patienten Fri. um den Normalwert schwankend (195 mg/100ml ; 210 mg/100ml ; 245 mg/100ml).

b) Bei der Patientin Ku. leicht erhöht (245 mg/100ml) .

c) Beim Patienten Stra. stark erhöht (390 mg/100ml ; 450 mg/100ml ; 390 mg/100ml).

Durch zahlreiche Arbeiten ist seit langer Zeit bekannt, daß bei Diabetikern die α_2-Fraktion der Serumproteine vermehrt ist (SCHEURLEN 1955 ; SCHERTENLEIB und TULLER 1958 ; EJARQUE et al. 1959 ; DITZEL und MOINAT 1959 ; LARSSON und STERKY 1962 ;

SKANSE 1963 ; JONSSON et al.1963). Die α_2-Fraktion der Serumproteine besteht aus folgenden Komponenten: α_2-Makroglobulin, Haptoglobin, Coeruloplasmin. Erst in neuerer Zeit konnte gezeigt werden, daß die α2-Globulinvermehrung bei Diabetikern zum grossen Teil durch eine spezifische Vermehrung des α2M bewirkt wird (daneben ist auch das Haptoglobin vermehrt) (JAMES et al.1966b ; GANROT 1967a ; GANROT et al.1967 ; CLEVE et al.1968).

CLEVE et al.geben für Diabetiker einen α2M-Spiegel von 242±84 mg/100ml an, gegenüber 186±44 mg/100ml bei Normalpersonen. Nach diesen Befunden liegt der α2M-Gehalt von Diabetikerseren im Durchschnitt bei 130% der Norm. GANROT fand bei erwachsenen Diabetikern einen auf 123% beziehungsweise 127% der Norm erhöhten α2M-Spiegel.

Durch die in den Abbildungen 8 bis 13 dargestellten HEIDELBERGER-Kurven wurde der α2M-Gehalt von 19 Diabetikerseren ermittelt. Die statistische Auswertung ergibt einen Mittelwert von 300±95 mg α2M/100ml. Im Durchschnitt liegt also der α2M-Spiegel von Diabetikerseren nach diesen Befunden bei 133% der Norm, ein Ergebnis, das mit der Literatur gut übereinstimmt.

In Abb.14 schließlich ist die HEIDELBERGER-Kurve vom Serum des Analbuminämiepatienten K.Br. dargestellt. Der α2M-Gehalt dieses Serums ist mit 675 mg/100ml sehr stark erhöht. Auch dieser Befund steht im Einklang mit den Angaben in der Literatur (SCHULTZE und SCHWICK 1959 ; HITZIG in ALY et al.1968).

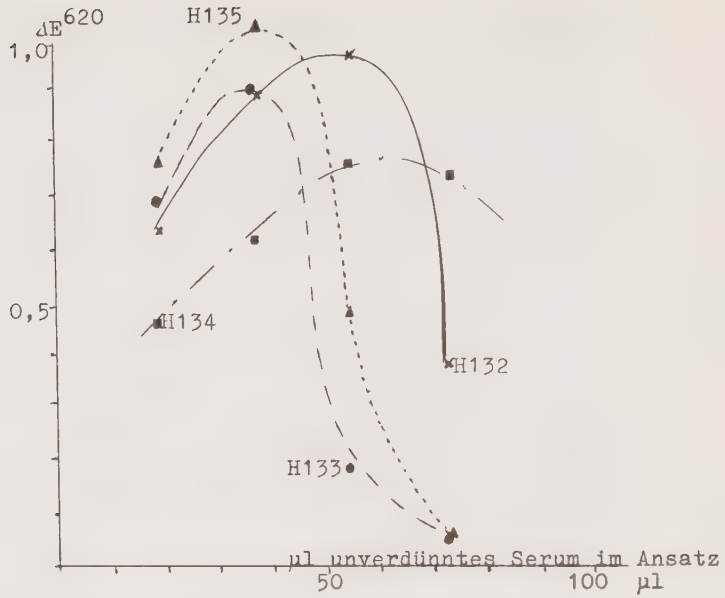


Abb.8 HEIDELBERGERKURVEN von 4 Diabetikerseren

Antigen: Serum Le.vom23.4.65 (pH7,28) = H132
Serum Li.vom16.7.65 (pH7,28) = H133
Serum Rich.vom 3.5.66 (pH7,20) = H134
Serum Rie.vom28.3.66 (pH7,30) = H135

Die Ansätze wurden vor Zusatz des Antikörpers mit physiol. Kochsalzlösung jeweils auf 100µl aufgefüllt

Antikörper (für alle 4 Kurven gleich):

Je 200µl Anti-α2M op.1044
(Stammlösung 1:5 verdünnt)

Inkubation des AG-AK-gemischs:

27 Std. bei 22°C
(gilt für alle 4 Kurven)

Prot.-Nr.	Lage des Äquivalenzpunktes	α2M-Gehalt (mg/100ml)
H132	bei 55µl unverd. Serum	245 mg/100ml
H133	bei 35µl unverd. Serum	390 mg/100ml
H134	bei 60µl unverd. Serum	225 mg/100ml
H135	bei 35µl unverd. Serum	390 mg/100ml

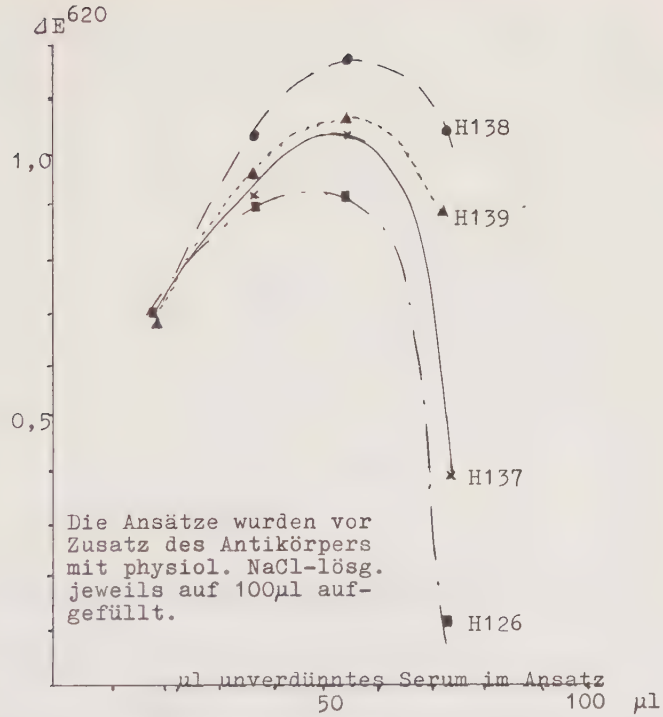


Abb.9 HEIDELBERGER-Kurven von 4 Diabetikerseren

Antigen: Serum Bu. vom 2.8.66 (pH7,37) = H126
Serum Schu. vom 2.6.66 (pH7,18) = H137
Serum Slo. vom 16.6.66 (pH7,05) = H138
Serum Stro. vom 28.6.65 (pH7,25) = H139

Antikörper (für alle 4 Kurven gleich):

Je 200µl Anti-α2M op.1044
(Stammlösung 1:5 verdünnt)

Inkubation des AG-AK-gemischs:

30 Std. bei 22°C
(gilt für alle 4 Kurven)

Prot.-Nr.	Lage des Äquivalenzpunktes	α2M-Gehalt
H126	bei 45µl unverd. Serum	300 mg/100ml
H137	bei 55µl unverd. Serum	245 mg/100ml
H138	bei 55µl unverd. Serum	245 mg/100ml
H139	bei 55µl unverd. Serum	245 mg/100ml

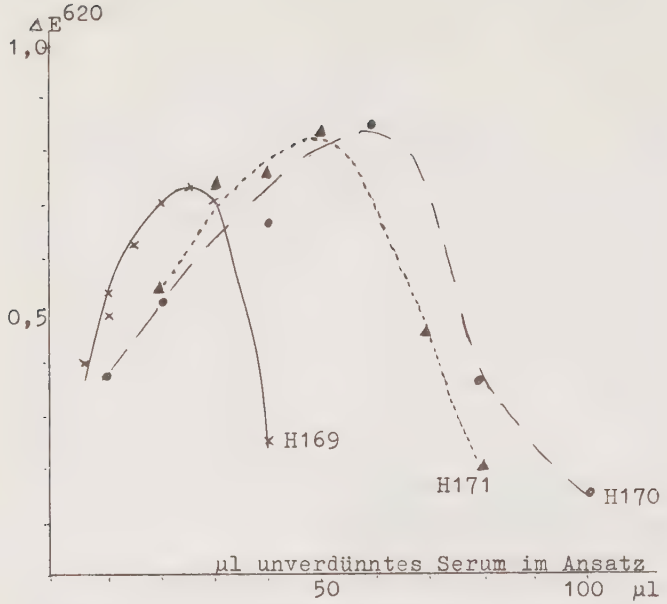


Abb.10 HEIDELBERGER-Kurven von 3 Diabetikerseren

Antigen: Serum Ott. = H169
Serum Rei. = H170
Serum Scho. = H171

Antikörper (für alle 3 Kurven gleich):

Je 200µl Anti-α2M op.1044
(Stammlösung 1:5 verdünnt)

Inkubation des AG-AK-gemischs:

22 Std. bei 4°C

Prot.-Nr.	Lage des Äquivalenzpunktes	α2M-Gehalt
H169	bei 25µl unverd. Serum	540 mg/100ml
H170	bei 60µl unverd. Serum	225 mg/100ml
H171	bei 50µl unverd. Serum	270 mg/100ml

Die Ansätze wurden vor Zugabe des Antikörpers mit Phosphatpuffer (0,01m ; pH 7,4) jeweils auf 100µl aufgefüllt.

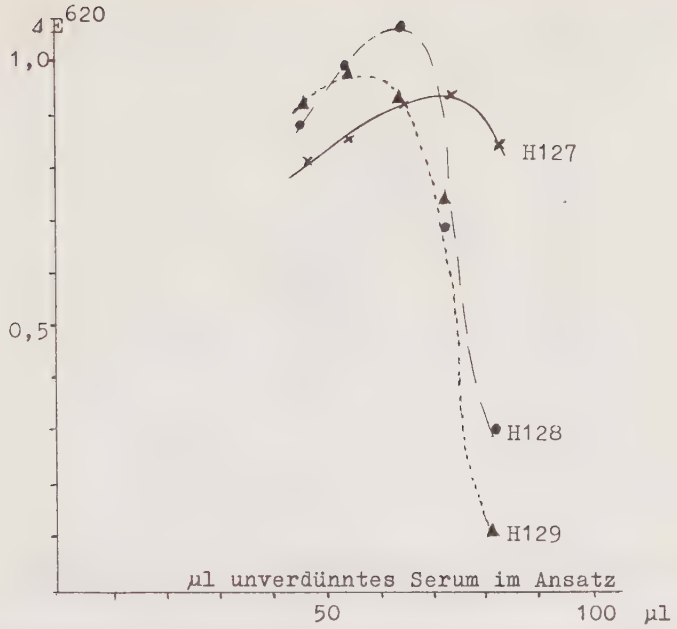


Abb.11 HEIDELBERGER-Kurven von drei verschiedenen Seren des Patienten Fri.

Antigen: Serum Fri. vom 11.7.66 = H127
Serum Fri. vom 23.7.66 = H128
Serum Fri. vom 11.8.66 = H129

Die Seren waren alle auf pH 7,35 eingestellt. Die Ansätze wurden vor Zusatz des Antikörpers mit physiol. Kochsalzlösung jeweils auf 100µl aufgefüllt.

Antikörper (für alle 3 Kurven gleich):

Je 200µl Anti-α2M op.1044
(Stammlösung 1:5 verdünnt)

Inkubation des AG-AK-gemischs:
30 Std. bei 22°C

Prot.-Nr.	Lage des Äquivalenzpunktes	α2M-Gehalt
H127	bei 70µl unverd. Serum	195 mg/100ml
H128	bei 65µl unverd. Serum	210 mg/100ml
H129	bei 55µl unverd. Serum	245 mg/100ml

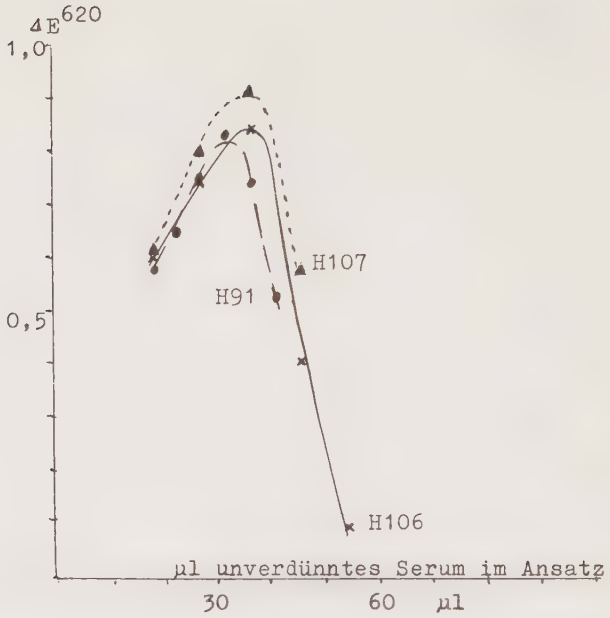


Abb.12 HEIDELBERGER-Kurven von drei verschiedenen Seren des Patienten Stra.

Antigen: Serum Stra. vom 16.8.65 = H106
Serum Stra. vom 23.8.65 = H91
Serum Stra. vom 30.8.65 = H107

Die Ansätze wurden vor Zusatz des Antikörpers mit physiol. Kochsalzlösung jeweils auf 100µl aufgefüllt.

Antikörper (für alle 3 Kurven gleich):

Je 250µl Anti-α2M op.870
(Stammlösung 1:5 verdünnt)

Inkubation des AG-AK-gemischs:

H91: 150 Std. bei 4°C
H106 und H107: 64 Std. bei 4°C

Prot.-Nr.	Lage des Äquivalenzpunktes	α2M-Gehalt
H91	bei 31µl unverd. Serum	450 mg/100ml
H106	bei 35µl unverd. Serum	390 mg/100ml
H107	bei 35µl unverd. Serum	390 mg/100ml

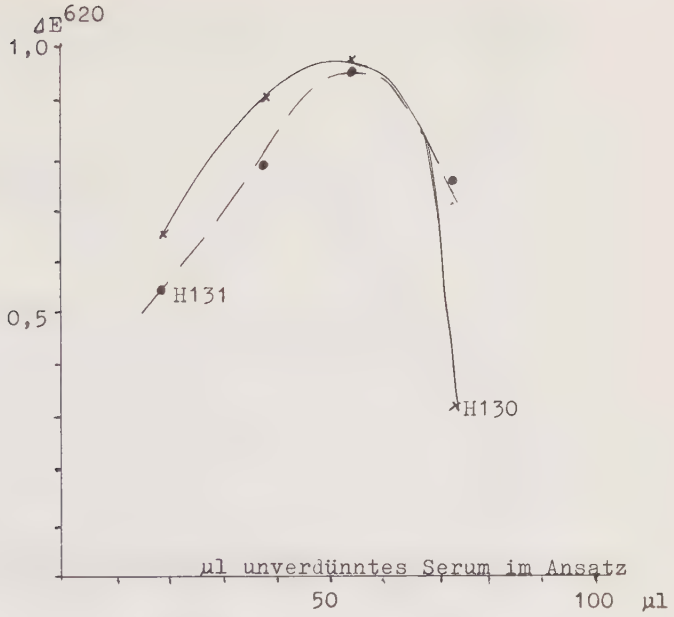


Abb.14 HEIDELBERGER-Kurven von zwei verschiedenen Seren der Patientin Ku.

Antigen: Serum Ku. vom 23.8.65 = H130
Serum Ku. vom 13.10.65 = H131

Antikörper (für beide Kurven gleich):

Je 200µl Anti-α2M op.1044
(Stammlösung 1:5 verdünnt)

Inkubation des AG-AK-gemischs:

30 Std. bei 22°C
(gilt für beide Kurven)

Prot.-Nr.	Lage des Äquivalenzpunktes	α2M-Gehalt
H130	bei 55µl unverd. Serum	245 mg/100ml
H131	bei 55µl unverd. Serum	245 mg/100ml

Die Ansätze wurden vor Zusatz des Antikörpers mit physiol. NaCl jeweils auf 100µl aufgefüllt. pH-Wert der Seren: 7,35

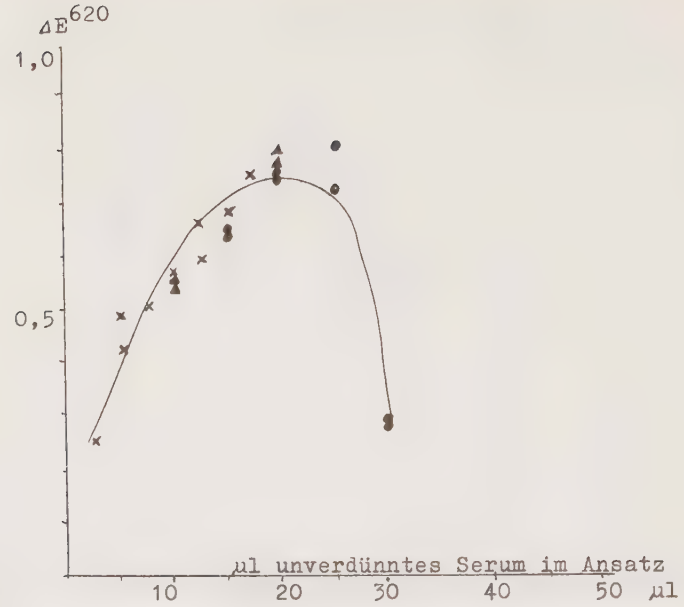


Abb. 15 HEIDELBERGER-Kurve vom Serum des Analbuminämiepatienten K.Br.

Antigen: Serum K.Br. vom 6.4.66
Die Ansätze wurden vor Zusatz des Antikörpers mit physiol. Kochsalzlösung jeweils auf 100µl aufgefüllt .

Antikörper:
Je 250µl Anti-α2M op.870
(Stammlösung 1:5 verdünnt)

Die eingezeichnete Kurve stellt die Resultierende aus drei Doppelansätzen dar. Die Inkubationsdauer des AG-AK-gemischs betrug
bei Ansatz H84/85: 7 Tage bei 4°C,(▲)
bei Ansatz H86/87: 5 Tage bei 4°C,(×)
bei Ansatz H104/105: 38 Std. bei 4°C(•).

Da bei den beiden ersten Kurvenpaaren der Äquivalenzpunkt nicht erreicht wurde, mußte zur Abklärung ein weiteres Kurvenpaar aufgenommen werden . Die Unterschiede in den Inkubationszeiten können eine Vertikalverschiebung der Kurven zur Folge haben, sie ist aber so gering, daß eine resultierende Kurve eingezeichnet werden kann

Der Äquivalenzpunkt liegt bei 20µl unverd. Serum; der α2M-Gehalt beträgt 675 mg/100ml.

5. Untersuchung der Bindung von Insulin an α2M

5.1. Materialien

Trägerinsulin ; Stammlösung (100µg/ml)

20 mg krist. Rinderinsulin (Hoechst)
100ml aqua dest.
2ml 1n HCl
96ml SØRENSEN-Phosphatpuffer pH 7,5
2ml 1n NaOH
Die Reagenzien werden in der angegebenen Reihenfolge miteinander vermischt. Die Lösung wird bei -20° aufbewahrt.

131J-markiertes Rinderinsulin (Hoechst)

Spezifische Aktivität und Konzentration der Präparate betrugen je nach Charge etwa 9 mCi/mg Insulin und 0,04 mg Insulin/ml. Präparate, die älter als 10 bis 11 Tage waren, wurden nicht verwendet.

Alles übrige Material (Antikörperlösungen, Patientenseren, gereinigtes α2M) war das gleiche wie bei den HEIDELBERGER-Kurven.

5.2. Methode

5.2.1. Allgemeines zur Methode

Die Bindungsmessungen erfolgten mit Hilfe der von KALLEE et al.(1963a) angegebenen immunologischen

Methode. Der entscheidende Vorteil dieser Methode liegt darin, daß man die Bindungsphänomene in physiologischem Milieu untersuchen kann. Störende Einflüsse durch die meisten Proteine des Antiserums werden vermieden, da der Antikörper in gereinigter Form eingesetzt wird. Das Prinzip der Methode wurde bereits auf S.3 beschrieben.

5.2.2. Wahl des Verhältnisses Antigen zu Antikörper

Bei Bindungsmessungen mit der angegebenen Methode muß man auf alle Fälle vermeiden, in den Bereich rechts vom Maximum der HEIDELBERGER-Kurven zu geraten, wo sich lösliche Antigen-Antikörperkomplexe bilden. Bei allen in diesem Abschnitt beschriebenen Versuchsreihen wurde deshalb der Antikörper in geringem Überschuß zugegeben, so daß kein α2M im Überstand verbleiben konnte.

5.2.3. Einfluß der Antikörperkonzentration auf die Meßgenauigkeit

Für die ersten orientierenden Versuche wurde die Stammlösung des Antikörpers op.870 unverdünnt eingesetzt. In diesen Fällen erschien ein grobflockiges Präzipitat fast unmittelbar nach Zugabe des Antikörpers. In Tabelle 2 sind die Meßwerte angegeben, die bei sechs völlig identisch behandelten Ansätzen nach diesem Verfahren erzielt wurden:

Tabelle 2 Bindung von Insulin an α2M: Streuung der Meßwerte bei zu hoher Antikörperkonzentration (Protokoll-Nr. H70)

Ansatz Nr.	Präzipitat ungewaschen	Präzipitat 1xgewaschen	Präzipitat 2xgewaschen	Präzipitat 3xgewaschen
1	20,6%	11,8%	9,2%	8,3%
2	24,0%	15,9%	13,5%	12,5%
3	33,0%	26,2%	22,5%	20,6%
4	34,8%	25,0%	19,6%	16,6%
5	20,2%	11,8%	9,7%	9,1%
6	51,5%	40,0%	33,0%	28,5%

Bei dieser Versuchsreihe wurden folgende Bedingungen eingehalten:

Antigen: α2M-Standard op.151165; je 25µl der 1:2 verdünnten Stammlösung

Antikörper: Anti-α2M op. 870
Je 50µl der unverdünnten Stammlösung

Insulinkonzentration vor Zusatz des AK:
10 µg/ml

Inkubation des AG-Insulingemischs:
1 Std. bei 22°C

Inkubation des AG-AK-gemischs:
12 Std. bei 22°C

In der Tabelle sind die "Prozent gebundene Radioaktivität" angegeben. Zur Definition dieses Begriffs s. Abschnitt 5.2.5.

Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß die Methode in dieser Form infolge der großen Schwankungsbreite der Werte unbrauchbar ist. Vermutlich läuft die Antigen-Antikörperreaktion beim Arbeiten mit derart hoch konzentrierten Antikörperlösungen überstürzt ab: Es entstehen wahrscheinlich grobe, ungleichmäßige Präzipitatflocken, die unkontrollierbare Mengen gelöster Substanz mitreißen. Durch den Waschprozeß können diese rein mechanisch eingeschlossenen Anteile der Radioaktivität nicht mehr entfernt

werden, wie aus der Tabelle hervorgeht.

Diese Überlegung führte zu dem Versuch, durch geringere Konzentration des Antikörpers eine Verzögerung im Ablauf der Reaktion zu erreichen. Tatsächlich erscheint das Präzipitat viel langsamer, in Form eines gleichmäßigen, zarten Schleiers, wenn die Antikörperstammlösung vor Gebrauch im Verhältnis 1:5 (1 Teil Stammlösung plus 4 Teile physiol. Kochsalzlösung) verdünnt wird.

Tabelle 3 zeigt, daß durch diese Technik die Schwankungsbreite der Werte erheblich verringert wird.

Tabelle 3 Bindung von Insulin an α2M: Streuung der Meßwerte beim Arbeiten mit verdünnten Antikörperlösungen (Protokoll-Nr. H75)

Ansatz Nr.	Präzipitat ungewaschen	Präzipitat 1xgewaschen	Präzipitat 2xgewaschen	Präzipitat 3xgewaschen
1	26,8%	23,5%	22,7%	22,1%
2	26,5%	23,1%	22,8%	21,9%
4	20,4%	17,2%	16,5%	16,2%
5	21,5%	18,0%	17,1%	16,6%
6	21,0%	17,8%	16,8%	16,2%

Bei dieser Versuchsreihe wurden folgende Bedingungen eingehalten:

Antigen und Insulinkonzentration waren dieselben wie bei der Versuchsreihe H70 (Tabelle 2)

Antikörper: Je 250µl Anti-α2M op.870 (Stammlösung 1:5 verdünnt)

Inkubation des AG-Insulingemischs: 23 Std. bei 37°C

Inkubation des AG-AK-gemischs: 20 Std. bei 37°C

Die Ansätze 4-6 enthielten zusätzlich Cialit (Konzentration ca. 100 µg/ml).

5.2.4. Die Bedeutung des Waschprozesses

Die beiden Tabellen 2 und 3 zeigen die Verringerung der im immunologischen Präzipitat enthaltenen Radioaktivitätsmenge durch den Waschprozeß. Bei der Versuchsreihe H70, die mit der konzentrierten Antikörperlösung durchgeführt wurde, ist ein besonders großer Waschеffekt zu beobachten und auch zu erwarten: Ein Niederschlag, der besonders viel Verunreinigungen enthält, wird beim Waschen mehr davon abgeben, als ein anderer, der sauberer ist.

Die Art der Kräfte, die die markierten Moleküle an das Protein ketten, ist unbekannt. Mit größter Wahrscheinlichkeit handelt es sich dabei aber nicht um Hauptvalenzkräft. Es ist daher zu erwarten, daß auch nach sehr oft wiederholten Waschungen durch weitere derartige Prozeduren immer noch Anteile der gebundenen Radioaktivität verloren gehen. Denn die markierten Moleküle werden sich immer zwischen der Oberfläche der Antigen-Antikörperkomplexe und der Waschflüssigkeit im Sinne eines Gleichgewichts verteilen. Daher ist es notwendig, die Zahl der Waschungen willkürlich festzulegen. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Zahl auf zwei festgesetzt.

Der Waschprozeß ist ein kritischer Schritt bei der Verarbeitung der voluminösen, gelartigen Präzipitate, die zudem nur in winzigen Mikrogramm-Mengen vorliegen (AMBROSIUS und LEHMANN 1967). Man wird kaum in allen parallelen Ansätzen einer Versuchs-

reihe exakt die gleichen Bedingungen erreichen können, insbesondere was den Grad der Suspendierung und Durchmischung betrifft. Ein großer Teil des Fehlerrisikos der Methode dürfte zu Lasten dieses Arbeitsvorganges gehen. Doch lassen sich mit einer geschickten Technik recht gute Ergebnisse erzielen, wenn die Präzipitate möglichst gleichmäßig und fein verteilt werden.

Eine Möglichkeit, das zu erreichen, besteht darin, die Präzipitate mitsamt der Waschflüssigkeit einzufrieren. Beim Auftauen zerfallen die Niederschläge zu einer homogenen Suspension (KALLEE). Bei den hier beschriebenen Versuchen wurde jedoch folgendermaßen gearbeitet:

Die Gläschen werden bei 1700g 8 Minuten lang zentrifugiert. Dann wird mit Hilfe kapillar ausgezogener Glasröhrchen der Überstand möglichst quantitativ abgesaugt. Mit einem dünn ausgezogenen Glasstab werden die Präzipitate jetzt, vor Zugabe der Waschflüssigkeit kräftig gerührt. Es entsteht ein dicker Brei. Die Waschflüssigkeit wird zugegeben und nochmals kräftig gerührt. Dabei entsteht mühelos eine homogene Suspension.

Wird das Präzipitat nicht schon vor Zugabe der Waschflüssigkeit gerührt, dann hat man häufig große Schwierigkeiten, es hinterher zu homogenisieren. Der Fehler, der dadurch entsteht, daß Teile der Suspension am Glasrührer hängen bleiben, kann bei sehr sorgfältigem Arbeiten und bei Verwendung eines dünn ausgezogenen Glasstabs auf ein tragbares Maß reduziert werden .

5.2.5. Messung der im immunologischen Präzipitat enthaltenen Insulinmenge

Zur Messung der im immunologischen Präzipitat enthaltenen Insulinmenge könnte man im Prinzip biologische Testmethoden verwenden. Einfacher ist es, mit radioaktiv markiertem Insulin zu arbeiten. In der vorliegenden Arbeit wurde im allgemeinen eine Lösung kristallisierten Rinderinsulins in Phosphatpuffer verwendet, der geringe Mengen trägerfreien, 131J-markierten Insulins zugesetzt wurden. Wenn man annimmt, daß sich markiertes und unmarkiertes Insulin dem α2M gegenüber gleich verhalten, dann ist die im Präzipitat wiedergefundene Radioaktivität ein Maß für die durch das α2M gebundene Menge von Insulin (oder Insulinspaltprodukten).

Normalerweise wurde für die Bindungsmessungen eine Insulinkonzentration von 10 µg/ml gewählt. Die zugesetzte Menge an markiertem Insulin wurde stets so bemessen, daß sich für die Zählgeräte günstige Impulsraten ergaben. In einem Szintillationszähler der Fa. Frieseke & Hoepfner (Erlangen) wurden von jedem Ansatz folgende Größen gemessen:

a) Gesamtaktivität von immunologischen Präzipitaten plus Überstand, also die Ausgangsradioaktivität;
b) Aktivität der zweimal gewaschenen Präzipitate;
c) Aktivität der leeren, zweimal mit Glycinpuffer nach HEINZEL (Lösung IX von S.8) nachgewaschenen Gläschen.

Zur Auswertung wurde die Differenz aus den Meßwerten b und c gebildet. In den Tabellen und Diagrammen ist diese Differenz in Prozent der Ausgangsradioaktivität als "Prozent gebundene Radioaktivität" angegeben.

5.2.6. Leistungsfähigkeit der Methode

Die Leistungsfähigkeit der Methode wurde mit der gleichen Methode untersucht, die bei der Abschätzung des Fehlerrisikos der α2M-Bestimmung angewendet wurde: Insgesamt 290 einzelne Meßwerte ließen sich zu 141 Gruppen zusammenfassen (133 Gruppen zu je 2 Werten und 8 Gruppen zu je 3 Werten). Die Werte innerhalb einer jeden Gruppe waren unter völlig identischen Bedingungen bestimmt und daher vergleichbar. Man findet, daß die Einzelwerte um Null bis (in einem Extremfall) um 22 Prozent, im Durchschnitt um 4,7 Prozent von ihrem jeweiligen Mittelwert abweichen.

5.3. Bindung von Insulin durch α2M in Normalserum

5.3.1. Einfluß der Inkubationstemperatur auf die Bindung

Die Abbildung 15 zeigt den Einfluß, den die Inkubationstemperatur auf die Bindung von Insulin

durch α2M im Normalserum ausübt.

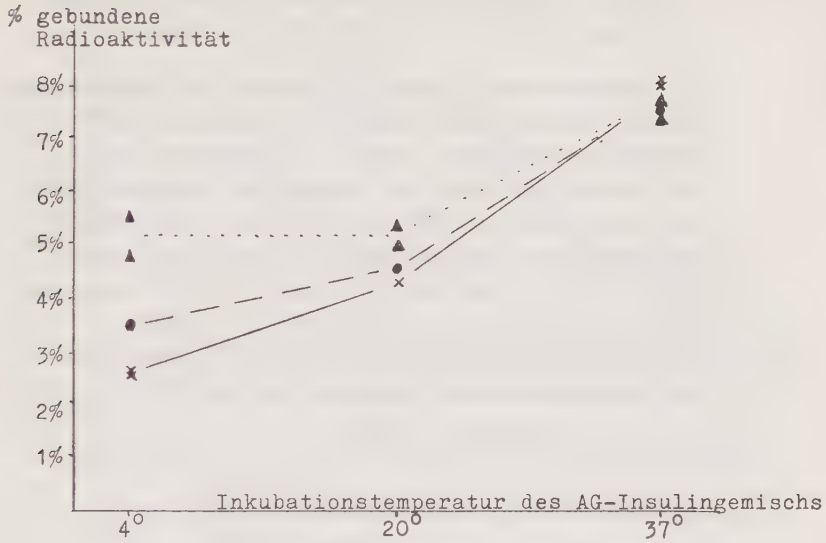


Abb.15 Einfluß der Inkubationstemperatur auf die Bindung von Insulin an das α2M in Normalserum (Protokoll Nr.H160)

Antigen: Je 50µl Normalserum, mit physiol. Kochsalzlösung auf 100µl aufgefüllt

Antikörper: Je 200µl Anti-α2M op.1044 (Stammlösung 1:5 verdünnt)

Insulinkonzentration vor Zusatz des AK:

10µg/ml

Inkubation des AG-Insulingemischs:

20 Std.; Temperatur s. Abszisse

Inkubation des AG-AK-gemischs:

ausgezogene Kurve: 28 Std. bei 4°
gestrichelte Kurve: 28 Std. bei 20°
getüpfelte Kurve: 28 Std. bei 37°

Es handelt sich jeweils um Doppelbestimmungen, die nur bei der getüpfelten Kurve so weit streuen, daß sie im Diagramm voneinander trennbar sind.

Aus Abbildung 15 läßt sich folgendes ablesen:

1. Ganz allgemein haben steigende Inkubationstemperaturen erhöhte Bindungswerte zur Folge.

2. Die Temperatur, der die Ansätze nach Zugabe des Antikörpers ausgesetzt sind, beeinflußt die Bindungswerte nur dann, wenn die Inkubation des Antigen-Insulingemischs vor Zugabe des Antikörpers bei niedrigen Temperaturen erfolgte. Die Antigen-Antikörperkomplexe können also auch nach Beginn der Präzipitinreaktion noch Insulin binden. Diese nachträgliche Adsorption verläuft umso besser, je niedriger die Inkubationstemperatur vor Zusatz des Antikörpers war, und je höher sie nach Zusatz des Antikörpers gewählt wurde.

5.3.2. Einfluß der Inkubationsdauer auf die Bindung

Die Abbildungen 17 und 18 zeigen den Einfluß, den die Dauer sowohl der Antigen-Insulininkubation als auch die der Antigen-Antikörperinkubation auf die Bindung von Insulin durch das α2M im Normalserum ausübt.

Die Methode erlaubt nur, die Inkubationsdauer vor Zugabe des Antikörpers beliebig zu variieren. In Abb.17 verlaufen die Bindungswerte zumindest in den ersten 20 Stunden direkt proportional zur Länge dieses Zeitabschnitts.

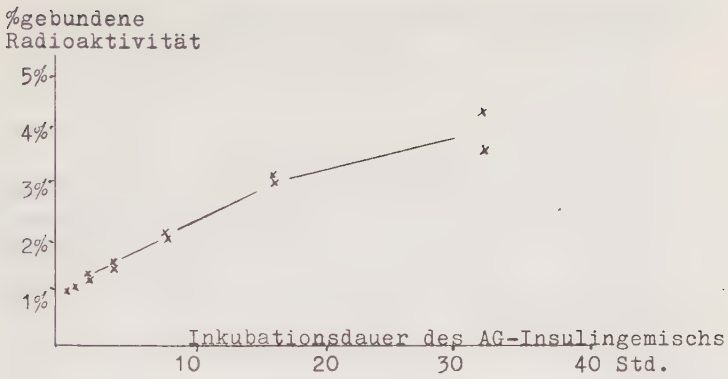


Abb.16 Einfluß der Inkubationsdauer des AG-Insulingemischs auf die Bindung von Insulin durch das α2M in Normalserum(Protokoll Nr.H161)

Antigen: Je 50µl Normalserum, mit Physiol. NaCl-lösung auf 100µl aufgefüllt

Antikörper: Je 200µl Anti-α2M op.1044 (Stammlösung 1:5 verdünnt)

Insulinkonzentration vor Zusatz des AK: 10 µg/ml

Inkubationstemperatur des AG-Insulingemischs: 20°C

Inkubation des AK-AK-gemischs: 35 Std. bei 4°C

Vom Augenblick des Antikörperzusatzes bis zur Weiterverarbeitung der Ansätze muß eine gewisse Mindestzeit verstreichen, damit die Präzipitationsreaktion quantitativ ablaufen kann. Da mit relativ konzentrierten und hochgereinigten Antikörperlösungen und außerdem in der Nähe des Äquivalenzpunktes gearbeitet wurde - beides Faktoren, die einen raschen Ablauf der immunologischen Ausfällung

begünstigen (KABAT und MAYER 1962) - kann man annehmen, daß diese Mindestdauer etwa einen Tag beträgt, sofern die Reaktion bei 4°C abläuft.

Abbildung 17 zeigt, daß bei 4°C die Inkubationsdauer des Inkubationsgemischs nach Zusatz des Antikörpers die Bindung von Insulin nicht beeinflußt. Unter den dargestellten Bedingungen geht also den Antigen-Antikörperkomplexen die Fähigkeit, Insulin aufzunehmen , völlig ab.

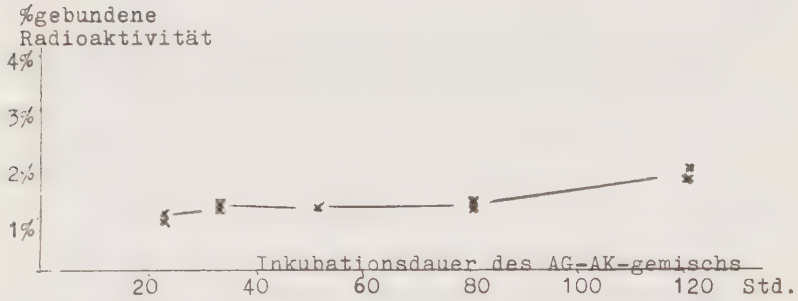


Abb.17 Einfluß der Inkubationsdauer des AG-AK-gemischs auf die Bindung von Insulin an das α2M in Normalserum (Protokoll Nr.H161)
Antigen und Antikörper wie in Abb.16
Insulinkonzentration wie in Abb.16
Inkubation des AG-Insulingemischs:
1 Std. bei 20°C
Inkubationstemperatur des AG-AK-gemischs:
4°C

5.3.3. Einfluß der Insulinkonzentration auf die Bindung

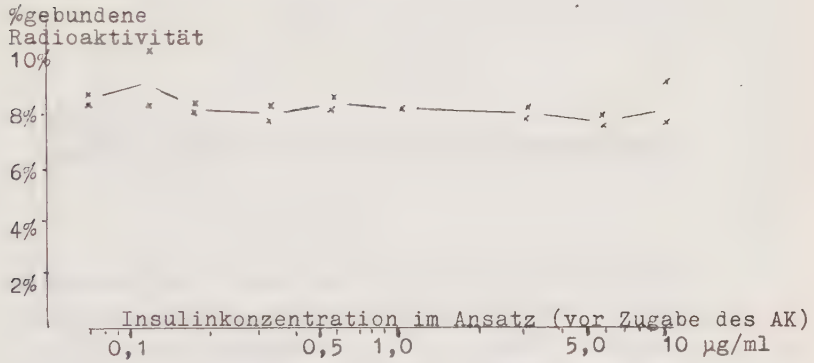


Abb.18 Einfluß der Insulinkonzentration im Ansatz auf die Bindung von Insulin an das α2M in Normalserum (Protokoll Nr.H155)

Antigen: Je 50µl Normalserum, mit Phosphatpuffer (0,1m;pH7,35) ad 100µl

Antikörper: Je 200µl Anti-α2M op.1044 (Stammlösung 1:5 verdünnt)

Inkubation des AG-Insulingemischs: 200 min bei 37°C

Inkubation des AG-AK-gemischs: 60 Std. bei 4°C

Abbildung 18 zeigt, daß beim Variieren der Insulinkonzentration um mehr als zwei Zehnerpotenzen stets der gleiche Prozentsatz der zugefügten Radioaktivität im Präzipitat wiedergefunden wird . Bei der dargestellten Versuchsreihe wurde nur die Konzentration

des Trägerinsulins variiert, bei konstanter Konzentration des markierten Insulins (0,07 µg/ml). Das gleiche Ergebnis wurde aber auch erhalten bei Wiederholung des Versuchs in einem etwa 2-3 Zehnerpotenzen niedrigeren Konzentrationsbereich unter Verwendung trägerfreien markierten Insulins.

5.3.4. Einfluß der α2M-Konzentration auf die Bindung

Abb.19 zeigt, wie sich zunehmende Verdünnung des α2M im Inkubationsgemisch (bei konstanter Insulinkonzentration) auf die Bindungswerte auswirkt: sie sind direkt proportional der α2M-Konzentration.

Die Meßwerte wurden gewonnen, indem konstante Mengen Normalserum zu Beginn der Antigen-Insulininkubation mit insulinhaltiger physiol. Kochsalzlösung auf verschiedene Volumina aufgefüllt wurden. Nach Zusatz jeweils konstanter Mengen (200µl) des Antikörpers hatte also das Antigen-Antikörpergemisch ebenfalls verschiedene Volumina (260µl; 310µl; 410µl; 510µl; 810µl). Es ist bekannt, daß die Menge eines immunologischen Präzipitats vom Volumen des Ansatzes, in dem die Präzipitinreaktion abläuft, beeinflußt wird. Die gestrichelte Kurve in Abb.19 zeigt, daß beim Anstieg des Ansatzvolumens von 510µl auf810µl tatsächlich eine signifikante Abnahme der Präzipitatmengen eintritt. Der Effekt ist aber viel zu gering, um für die Abnahme der Bindungswerte mit steigendem Ansatzvolumen verantwortlich zu sein.

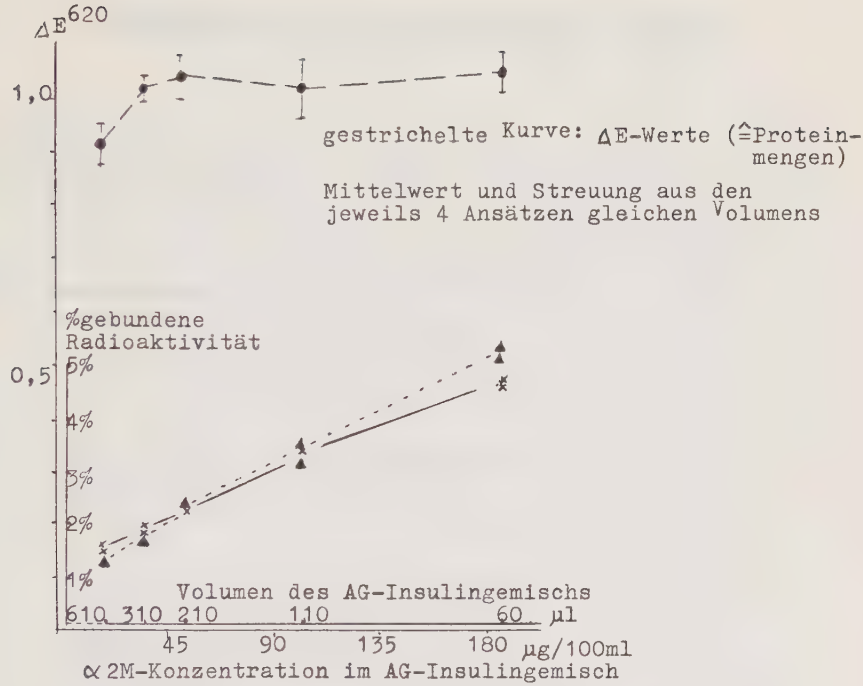


Abb.19 Einfluß der α2M-Konzentration im Ansatz auf die Bindung von Insulin an das α2M in Normalserum (Protokoll Nr.H161)

Antigen: Je 50µl Normalserum

Antikörper: Je 200µl Anti-α2M op.1044 (Stammlösung 1:5 verdünnt)

Inkubation des AG-Insulingemischs: 18 Std. bei 20°C

Inkubation des AG-AK-gemischs: 35 Std. bei 4°C

Zu Beginn der AG-Insulininkubation wurden die Ansätze mit insulinhaltiger physiol. NaCl-lösung auf die angegebenen Volumina gebracht. Bei der getüpfelten Kurve geschah dies mit einer Lösung, die trägerfreies 131J-Insulin enthielt; bei der ausgezogenen Kurve handelte es sich um eine Lösung, die nur unmarkiertes Insulin enthielt (diesen Ansätzen waren vorher jeweils gering; konstante Mengen von 131J-Insulin zugefügt worden). Insulinkonzentration vor Zusatz des AK in allen Fällen: 0,33 µg/ml .

5.4. Bindung von Insulin durch α2M in verschiedenen Patientenseren

In den Tabellen 4, 5 und 6 sind die Bindungswerte zusammengestellt, die bei der Untersuchung der 20 Patientenseren erhalten wurden, die bereits in Abschnitt 4.6. erwähnt sind (19 Diabetikerseren und ein Analbuminämieserum). Die Werte von Normalserum, das unter gleichen oder ähnlichen Bedingungen inkubiert wurde, sind jeweils mit angegeben.

Vergleicht man die Bindungswerte der Patientenseren untereinander und mit den Normalwerten, so ergibt sich folgendes:

1. Bei 7 Patientenseren sind die Bindungswerte stark (auf mehr als das Doppelte der Norm) erhöht. Bei 3 Patientenseren sind die Werte deutlich (auf fast das Doppelte der Norm) erhöht. Bei 5 Patientenseren liegen die Werte im Normbereich. Bei den restlichen 5 Patientenseren (darunter das Analbuminämieserum) sind die Werte unter die Norm erniedrigt.

2. Es lassen sich keine Beziehungen erkennen zwischen den Bindungswerten und dem α2M-Spiegel der untersuchten Seren.

3.Von den Patienten Ku., Fris. und Stra. wurden mehrere, zu verschiedenen Zeitpunkten abgenommene Seren untersucht. Bei den Patienten Ku. und Fris. schwanken die Werte im untersuchten Zeitraum ganz erheblich. Beim Patienten Stra. bleiben die Werte angenähert konstant.

Tabelle 4 Bindung von Insulin durch das α2M in verschiedenen Diabetikerseren

Versuchsreihe Nr.	Zur Bindungsmessung verwendetes Serum: Bezeichnung	Menge µl	α2M-gehalt im Ansatz µg	AG-Insulin-Inkubation	AG-AK-Inkubation	%Rad. gebunden	Bindungswert in % der Norm	α2M-Spiegel im untersuchten Serum mg/100ml
H133	Li. vom 16.7.65	18	78	20h/20°	30h/20°	7	155	390
H135	Rie. vom 28.3.66	18	78	20h/20°	27h/20°	13	290	390
H126	Bu. vom 2.8.66	36	121	19h/20°	30h/20°	2	44	300
H132	Le. vom 23.4.65	36	98	20h/20°	30h/20°	10	222	245
H137	Schu.vom 2.6.66	36	98	20h/20°	27h/20°	3,2	71	245
H138	Slo. vom 16.6.66	36	98	20h/20°	27h/20°	12,4	278	245
H139	Stro.vom 28.6.65	36	98	20h/20°	27h/20°	9	200	245
H134	Rich.vom 3.5.66	36	90	20h/20°	27h/20°	5	110	225
H130	Ku. vom 3.8.65	36	98	19h/20°	27h/20°	22	490	245
H131	Ku. vom 13.1065	36	98	19h/20°	27h/20°	4	90	245
H127	Fri. vom 11.7.66	64	137	20h/20°	30h/20°	1,7	38	195
H128	Fri. vom 27.7.66	54	125	20h/20°	30h/20°	8,2	182	210
H129	Fri. vom 11.8.66	45	123	20h/20°	30h/20°	1,6	35	245
H160	Normal-serum	50	112	20h/20°	28h/20°	4,5	100	225

Die Versuchsbedingungen sind in den Tabellen angegeben. Die angeführten Mengen der Patientenseren wurden zu Beginn der Inkubation mit physiol. NaCl-lösg. jeweils auf 100µl aufgefüllt. Insulinkonzentration vor Zugabe des AK in allen Fällen: 10µg/ml. Präzipitation mit den 1:5 verdünnten Stammlösungen der AK.

Tabelle 5 Bindung von Insulin durch das α2M in verschiedenen Diabetikerseren

Versuchsreihe Nr.	Zur Bindungsmessung verwendetes Serum: Bezeichnung	Serum: Menge µl	α2M-Gehalt im Ansatz µg	AG-Insulin-Inkubation	AG-AK-Inkubation	%Rad. gebunden	Bindungswert in % der Norm	α2M-Spiegel im untersuchten Serum mg/100ml
H169	Ott.	20	121	20h/20°	22h/4°	3,9	91	540
H171	Scho.vom 25.9.67	40	121	20h/20°	22h/4°	2,5	58	270
H170	Rei.	40	100	20h/20°	22h/4°	1,4	33	225
H160	Normalserum	50	112	20h/20°	28h/4°	4,3	100	225

Tabelle 6 Bindung von Insulin durch das α2M verschiedener Diabetikerseren und eines Analbuminämieserums

Versuchsreihe Nr.	Zur Bindungsmessung verwendetes Serum: Bezeichnung	Serum: Menge µl	α2M-Gehalt im Ansatz µg	AG-Insulin-Inkubation	AG-AK-Inkubation	%Rad. gebunden	Bindungswert in % der Norm	α2M-Spiegel im untersuchten Serum mg/100ml
H86	K.Br.vom 6.4.66	15	113	16h/4°	125h/4°	1,7	68	675
H106	Stra.vom 16.8.65	27	109	47h/4°	64h/4°	10,5	420	390
H91 (x)	Stra.vom 23.8.65	27	127	16h/4°	150h/4°	8,4	336	450
H107	Stra.vom 30.8.65	27	109	47h/4°	64h/4°	9,2	368	390
H77	Normalserum	50	112	23h/4°	40h/4°	2,5	100	225

(x): Insulinkonzentration vor Zusatz des AK bei H91: 3,3µg/ml

Die Anmerkung zu Tabelle 4 (s.S.51) gilt ebenfalls für die Tabellen 5 und 6.

5.5. Bindung von Insulin an gereinigtes α2M

In Tabelle 7 sind die Bindungswerte zusammengestellt, die bei der Untersuchung des α2M-Standardpräparats op.151165 erhalten wurden. Die Bindungswerte lagen zwischen 10,5 und 32 Prozent. Man erkennt, daß sie durch folgende Faktoren beeinflußbar sind:

1. Inkubationsdauer.
   In allen Unterabteilungen der Tabelle (α2M-Konzentration und Inkubationstemperatur jeweils konstant) nehmen die Bindungswerte mit der Inkubationsdauer zu. Die Proportionalität zwischen Inkubationszeit und Ausmaß der Bindung ist hier nicht so ausgeprägt, wie in Abb.16, aber in einigen Fällen doch gut zu erkennen (vgl. zum Beispiel H140/141 mit H102/103).
2. Antigenkonzentration.
   Erhöhte α2M-Konzentration im Antigen-Insulingemisch (bei konstanter Insulinkonzentration) wirkt sich in einer Erhöhung der Bindungswerte aus (vgl. zum Beispiel H142/143 mit H76(1-3)). Allerdings ist eine lineare Beziehung zwischen α2M-Konzentration und Bindungswerten nicht mit Sicherheit aus der Tabelle abzulesen (der niedrige Wert bei H100/101 dürfte Folge der geringen Inkubationsdauer des AG-Insulingemischs sein).

Tabelle 7 Bindung von Insulin durch gereinigtes α2M (Präparat op.151165)

Versuchsreihe Nr.	α2M-Insulininkubationsgemisch			AG-Insulininkubation	AG-AK-inkubation	%Rad.gebunden	
	α2M-gehalt µg	Volumen µl	α2M-konz. mg/100ml			Mittelwert	Bereich
H118/119 (6)	90	100	90	24h/4° plus 2h/20°	26h/4°	17,0	16,5;17,5
H114/115 (7)	90	100	90	23h/4° plus 1h/20°	47h/4°	25,0	23,5;26,6
H140/141	112	100	112	23h/4°	24h/4°	zwischen 10,5 und 15,7(Abb.20)	
		Insulinkonzentration variabel					
H102/103 (4;5)	112	100	112	48h/4°	36h/4°	26,2	22,4;29,2 25,4;27,1
H110 (9;10)	112	100	112	51h/4°	41h/4°	28,3	28,3;28,3
H100/101 (2)	112	50	225	12h/4°	150h/4°	16,7	16,6;16,7
H76 (4-6)	112	25	450	24h/4°	40h/4°	29,2	27,8;29,2 30,5
H79 (1-3)	112	25	450	43h/4°	50h/4°	32,0	31,7;32,2
H142/143	112	100	112	23h/37°	24h/37°	zwischen 11,4 und 15,3(Abb.21)	
		Insulinkonzentration variabel					
H102/103 (6)	112	100	112	29h/37°	36h/37°	17,2	16,2;18,2
H110 (1;2)	112	100	112	51h/37°	41h/37°	19,7	18,3;21,0
H75 (1-3)	112	25	450	23h/37°	20h/37°	22,8	22,7;22,8
H76 (1-3)	112	25	450	24h/37°	23h/37°	22,2	21,2;22,2 23,3

Insulinkonzentration in den Ansätzen vor Zugabe desAK: 10 ug/ml

Zur Präzipitation dienten die 1:5 verdünnten Stammlösungen der Antikörperpräparate op.870 oder op.1044

In den Abbildungen 20 und 21 ist dargestellt, wie sich die Bindung von Insulin durch gereinigtes α2M bei variabler Insulinkonzentration verhält: Innerhalb der Fehlergrenzen sind die Bindungswerte wie im Normalserum unabhängig von der Insulinkonzentration.

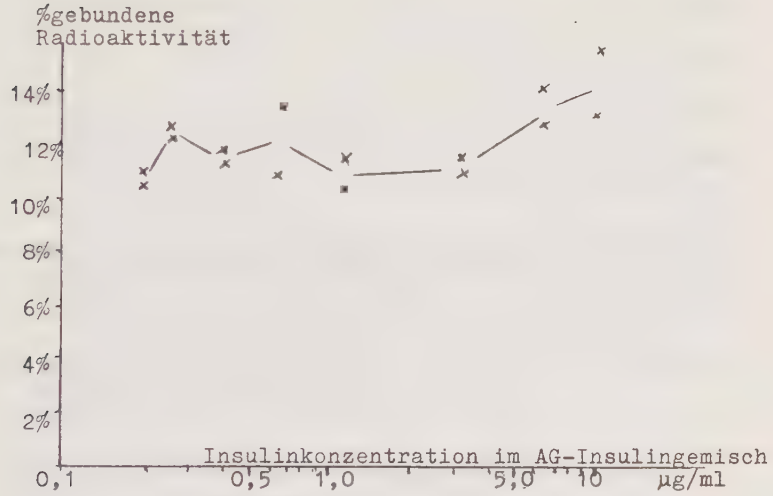


Abb.20 Bindung von Insulin durch gereinigtes α2M; Abhängigkeit der Bindungswerte von der Insulinkonzentration (Protokoll Nr.H140/141)

Antigen: Je 12,5µl α2M-Standard op.151165 (pH7,4), mit physiol. NaCl ad 100µl

Antikörper: Je 200µl Anti-α2M op.1044 (Stammlösung 1:5 verdünnt)

Inkubation des AG-Insulingemisches: 23 Std. bei 4°C

Inkubation des AG-AK-gemischs: 24 Std. bei 4°C

In den Ansätzen waren jeweils konstante Mengen von 131J-Insulin enthalten (0,15µg/ml), Nur die Konzentration des Trägerinsulins wurde variiert.

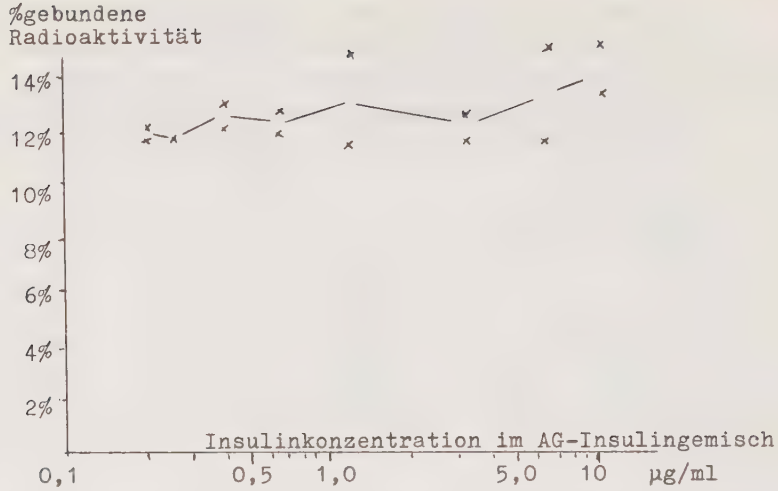


Abb.21 Bindung von Insulin durch gereinigtes α2M; Abhängigkeit der Bindungswerte von der Insulinkonzentration (Protokoll-Nr. H142/143)

Inkubation des AG-Insulingemischs und des AG-AK-gemischs bei 37°C. Alles übrige wie bei der Versuchsreihe H140/141 (Abb.20).

Beim Vergleich der absoluten Bindungswerte der in Abb.20 dargestellten Kurve mit denen von Abb.22 ergeben sich keine signifikanten Unterschiede. Die Inkubationsbedingungen waren bei beiden Versuchsreihen identisch, ausgenommen die Inkubationstemperatur. Folglich scheint die Inkubationstemperatur ohne Einfluß auf die Bindungswerte zu sein (vergleiche dazu aber die Diskussion!). Dieses Verhalten des gereinigten α2M ist überraschend und steht im Gegensatz zum Verhalten des α2M im Normalserum (Abb.15).

6. Insulinabbau durch gereinigtes α2M

6.1. Materialien

Trichloressigsäure (TCA)

Humanserumalbumin (Behringwerkem Marburg) (HSA)

Alle anderen hier verwendeten Materialien wurden bereits beschrieben.

Fast alle Versuchsreihen zum Insulinabbau wurden mit dem α2M-Präparat op.1165 durchgeführt. Einige Experimente mit dem Präparat op.151165 ergaben, daß auch dieses insulinspaltende Wirkung besaß. Ein drittes α2M-Präparat, das einige Jahre im Kühlschrank gestanden hatte, besaß diese Wirkung nicht (DÜRR und KALLEE 1967).

6.2. Methode

Der Insulinabbau wurde mit Hilfe der von TOMIZAWA et al.(1955) beschriebenen Methode verfolgt: Intaktes Insulin läßt sich nach Zugabe von Albumin durch Trichloressigsäure quantitativ präzipitieren, während Insulinspaltprodukte teilweise im Überstand der TCA-Fällung bleiben. Für die vorliegende Arbeit wurde die Methode zur Anwendung im Mikromaßstab folgendermaßen modifiziert:

Das α2M wurde mit dem 131J-Insulin mit oder ohne Zusatz von Trägerinsulin inkubiert. Inkubationsvolumen im allgemeinen 50µl. Zur Beendigung der Inkubation wurden 50µl Humanserumalbumin (200mg/100ml ; teilweise auch 1000mg/100ml) und anschliessend 100µl 10%ige Trichloressigsäure zugefügt. Die Radioaktivität der Präzipitate mitsamt dem Überstand wurde gemessen. Dann wurden die Präzipitate abzentrifugiert (1700g/8min) und ihre Aktivität nach zweimaligem Waschen mit je 100µl 5%iger Trichloressigsäure gemessen.

Leerwerte wurden bei jeder Versuchsreihe gewonnen durch Inkubation des Insulingemischs in physiol. Kochsalzlösung, in phosphatgepufferter Albuminlösung oder in Phospatpuffer. Albuminzusatz, TCA-Fällung und Aktivitätsmessung wie oben beschrieben.

In den Leerwerten waren im allgemeinen zwischen 5 und 10 Prozent der Radioaktivität durch TCA nicht präzipitierbar. Dieser Prozentsatz ließ sich auch durch prolongierte Dialyse des 131J-Insulinpräparats gegen Phosphatpuffer nicht verringern. Nach längerer Inkubation (12 Std. und mehr) wurden in den albuminhaltigen Leerwerten gelegentlich auch höhere Prozentwerte an nicht präzipitierbarer Radioaktivität gefunden (20 bis 30 Prozent).

Als Maß für die vom α2M zerstörte Insulinmenge dient die Differenz von Radioaktivität im Überstand der α2M-haltigen Ansätze minus Radioaktivität im Überstand der Leerwerte, beide ausgedrückt in Prozent der jeweils vor der TCA-Fällung im Ansatz vorhandenen Aktivität (Ausgangsaktivität). In den Diagrammen ist dieser Wert unter der Bezeichnung " %Radioaktivität durch α2M zerstört " als Ordinate eingetragen.

Die Leistungsfähigkeit der Methode wurde wie schon öfter beschrieben untersucht: 128 Einzelmessungen ließen sich zu insgesamt 64 Wertepaaren zusammenfassen, deren Einzelwerte unter identischen Bedingungen gewonnen waren. Die Einzelwerte wichen um Null bis (in einem Extremfall) um 20 Prozent, im Durchschnitt um 2,4 Prozent von ihrem jeweiligen Mittelwert ab.

6.3. Ergebnisse

6.3.1. Zeitabhängigkeit der Insulinspaltung

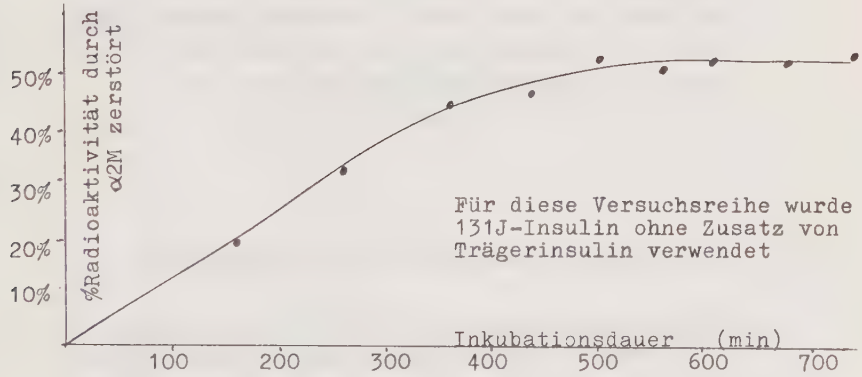


Abb.22 Zeitabhängigkeit der Insulinspaltung durch reines α2M (Protokoll-Nr. J21)

α2M-Konzentration im Inkubationsgemisch:
1600 µg/ml ≙ ca.2 nmol/ml

Insulinkonzentration im Inkubationsgemisch:
0,39 µg/ml ≙ ca. 0,065 nmol/ml

Inkubation in PO_4-Puffer (0,1m;pH7,4) bei 37°C

Abbildung 22 zeigt den zeitlichen Verlauf der Insulinspaltung durch das gereinigte α2M. Ein Teil der Radioaktivität bleibt auch nach vollständigem Ablauf der Reaktion durch TCA präzipitierbar. Dieser Anteil ist von einer 131J-Insulincharge zur anderen etwas verschieden. Im Durchschnitt liegt er bei etwa 20 bis 30 Prozent. Im Höchstfall können also 70 bis 80 Prozent des Insulins in TCA-lösliche Spaltprodukte überführt werden (ein ähnliches Verhalten beschreiben TOMIZAWA et al.1955 vom insulinspaltenden Enzym aus Lebergewebe). Das Plateau der Kurve in Abb.22 liegt unterhalb des eben genannten Wertes, da die in den Diagrammen eingezeichneten Werte " %Radioaktivität durch α2M zerstört" bereits um die im Leerwert gefundenen Werte korrigiert sind.

Die Abbildung 22 zeigt auch, daß es sich bei der Insulinspaltung um einen mit außerordentlich geringer Geschwindigkeit fortschreitenden Prozeß handelt: Nach 250 min sind erst etwa 30% des Insulins in TCA-lösliche Produkte überführt.

6.3.2. Temperaturabhängigkeit der Insulinspaltung

Abbildung 23 zeigt den zeitlichen Ablauf der Insulinspaltung bei zwei verschiedenen Temperaturen. Wie man sieht, läuft die Reaktion bei 37°C etwa dreimal schneller ab als bei 22°C. Bei 4°C schließlich konnte auch nach 24-stündiger Inkubation von ca. 4500µg α2M und 10µg Insulin pro ml keine signifikante Insulinspaltung nachgewiesen werden (DÜRR und KALLEE 1967).

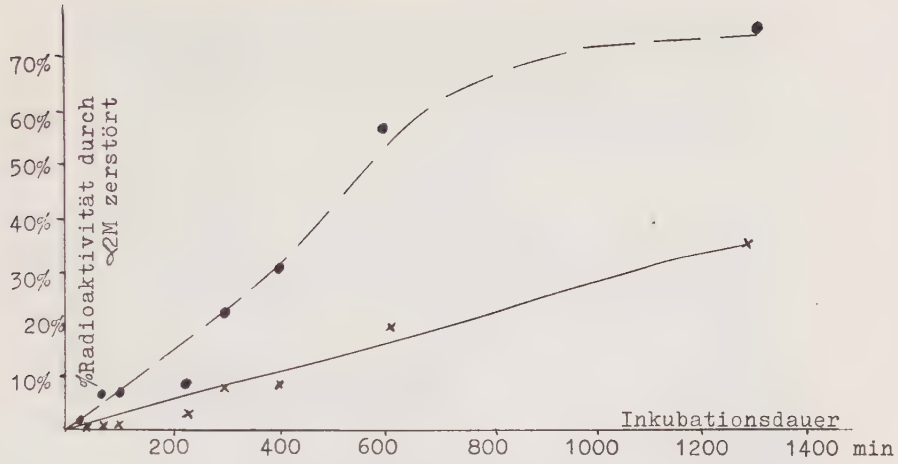


Abb.23 Temperaturabhängigkeit der Insulinspaltung durch gereinigtes α2M (Protokoll Nr.J17)

α2M-Konzentration im Inkubationsgemisch:
1600 µg/ml ≙ ca.2 nmol/ml

Insulinkonzentration im Inkubationsgemisch:
10 µg/ml ≙ ca.1,7 nmol/ml

Inkubationstemperatur:
gestrichelte Kurve: 37°C
ausgezogene Kurve: 22°C

Inkubation in PO_4-Puffer (o,1m ; pH 7,4)

6.3.3. Abhängigkeit der Insulinspaltung durch gereinigtes α2M von der Insulinkonzentration

Abbildung 24 zeigt, daß bei niedrigen Insulinkonzentrationen stets der gleiche Prozentsatz der Radioaktivität im TCA-löslichen Überstand gefunden wird; folglich nimmt die Absolutmenge der Spaltprodukte im gleichen Verhältnis wie die Insulin-

konzentration zu. Innerhalb des dargestellten Konzentrationsbereiches ist also die Geschwindigkeit der Spaltungsreaktion proportional zur Insulinkonzentration.

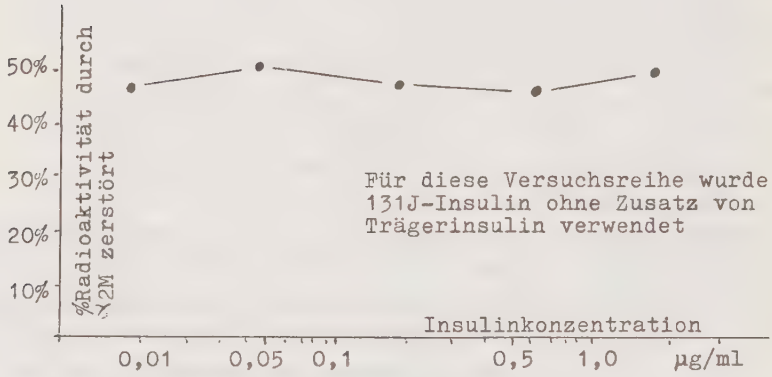


Abb.24 Abhängigkeit der Insulinspaltung durch gereinigtes α2M von der Insulinkonzentration

α2M-Konzentration im Inkubationsgemisch: 2000 µg/ml ≙ ca.2,4 nmol/ml

Inkubation in PO4-Puffer (0,1m; pH 7,4): 360 min bei 37°C

(Protokoll Nr.J22(9-13))

Abbildung 25 zeigt, daß bei höheren Insulinkonzentrationen die Proportionalität zwischen Insulinkonzentration und Reaktionsgeschwindigkeit nicht mehr besteht. Es erfolgt ein allmählicher Übergang in einen Reaktiostyp Nullter Ordnung (Umsatzgeschwindigkeit unabhängig von der Insulinkonzentration): das typische Verhalten von Enzymreaktionen beim Übergang in den Bereich der Substratsättigung.

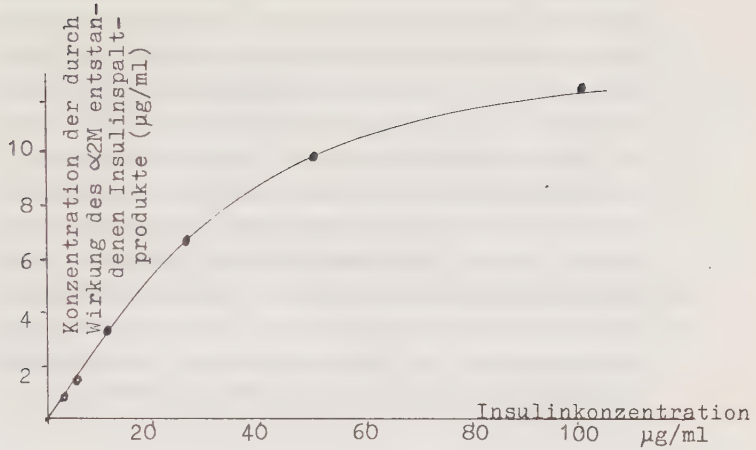


Abb.25 Abhängigkeit der Insulinspaltung durch gereinigtes α2M von der Insulinkonzentration (Protokoll-Nr. J22(1-8))

α2M-Konzentration im Inkubationsgemisch: 1940 ug/ml ≙ ca. 2,4 nmol/ml

Inkubation in PO_4-Puffer (0,1m ; pH 7,4): 360 min bei 37°C

Der Anschaulichkeit halber sind in Abb.25 nicht die "%Radioaktivität durch α2M zerstört" aufgetragen, sondern die aus dieser Größe und der Insulinkonzentration im Ansatz leicht zu bestimmende Konzentration der (durch Wirkung des α2M entstandenen) Insulinspaltprodukte im TCA-löslichen Überstand. Diese Größe ist ein direktes Maß für die Geschwindigkeit des Insulinabbaues.

Für diese Versuchsreihe wurden variable Konzentrationen von Trägerinsulin verwendet bei konstanter Konzentration des 131J-Insulins (ca.0,5 µg/ml).

Anhand der Abbildung 25 lassen sich folgende Überlegungen anstellen:

Die α2M-Konzentration in den Ansätzen liegt bei etwa 2,4 nmol/ml (berechnet aufgrund eines Molekulargewichtes des α2M von ca.800 000). Die Kurve beginnt bei einer Insulinkonzentration von etwa 10 µg/ml, entsprechend ca.1,7 nmol/ml (bezogen auf das Insulinmonomere mit MG=6000), von ihrem linear ansteigenden Verlauf abzuweichen; die ersten Zeichen einer beginnenden Substratsättigung des Enzyms zeigen sich also, sobald im Inkubationsgemisch mehr als etwa 0,7 Mol Insulin auf 1 Mol α2M entfallen. Dabei ist noch zu berücksichtigen, daß bei pH 7,4 der größte Teil des Insulins in aggregierter Form vorliegt (KLOSTERMEYER und HUMBEL 1966).

Im höchsten Punkt der Abbildung 25, bzw. der in ihr dargestellten Kurve, liegen folgende Verhältnisse vor: α2M-Konzentration = 2,4 nmol/ml ; Insulinkonzentration = ca. 17 nmol/ml. Nach einer Inkubationszeit von 360 min waren 12,5% der Radioaktivität durch Wirkung des α2M löslich geworden, es waren also mindestens 2,1 nmol Insulin zerstört worden. Daraus errechnet sich die bemerkenswert niedrige Wechselzahl von ca. $2,4 \times 10^{-3}$ Mol zerstörtes Insulin pro Mol α2M und Minute.

Bei dieser Berechnung ist nicht berücksichtigt, daß ein Teil der Insulinspaltprodukte TCA-unlöslich ist. Außerdem verläuft die Kurve im höchsten Punkt der Abb.25 noch nicht ganz horizontal, das heißt, das Enzym arbeitet noch nicht mit Maximalgeschwindigkeit. Es ist aber aus folgenden Gründen abzuschätzen, daß der angegebene Wert für

die Wechselzahl doch in der richtigen Größenordnung liegt:

1. Nur etwa 20-30 Prozent der Insulinspaltprodukte sind in TCA unlöslich (Abb.22).
2. Man erkennt am Verlauf der Kurve, daß bei weiterer Erhöhung der Insulinkonzentration die Absolutmenge der Spaltprodukte nicht mehr stark ansteigen kann, da die Kurve offenbar bald in eine Horizontale übergehen wird.

Die angeführten Einwände können also den Wert der Wechselzahl nicht allzusehr verfälschen. Die Tatsache bleibt bestehen, daß die insulinspaltende Aktivität des α2M-Präparats sehr gering ist.

6.3.4. Abhängigkeit der Insulinspaltung von der α2M-Konzentration

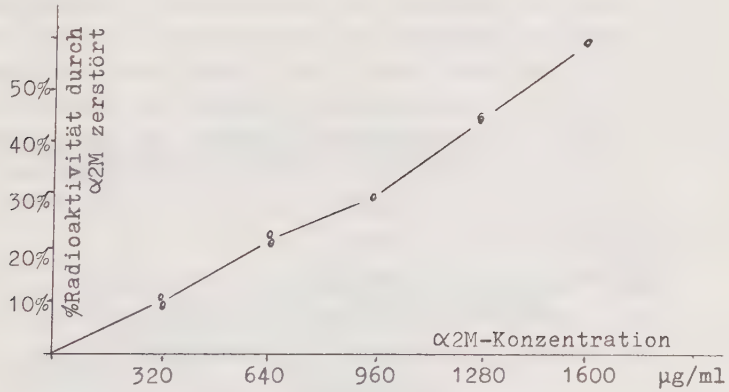


Abb.26 Abhängigkeit der Insulinspaltung durch gereinigtes α2M von der α2M-Konzentration

Insulinkonzentration im Inkubationsgemisch: 10 µg/ml

Inkubation in PO_4-Puffer (0,1m ; pH 7,4) 670 min bei 37°C

Aus Abbildung 26 entnimmt man, daß die Spaltungsgeschwindigkeit direkt proportional ist zur α2M-Konzentration. Dies ist ein für Enzymreaktionen typisches Verhalten.

6.3.5. Insulinspaltung in Gegenwart von Cialit

Alle bisher beschriebenen Versuchsreihen wurden nicht unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Um zu prüfen, ob die Umwandlung des Insulins in TCA-lösliche Spaltprodukte lediglich Folge eines bakteriellen Abbauprozesses ist, wurde bei einer Versuchsreihe zum Inkubationsgemisch Cialit bis zur mit Sicherheit bakteriziden Konzentration von 100 µg/ml zugefügt. In Tabelle 8 sind die Ergebnisse zusammengestellt. Man erkennt, daß der Insulinabbau auch nach Unterdrückung des Bakterienwachstums mit nahezu unveränderter Geschwindigkeit abläuft. Die geringfügige Hemmung, die zu beobachten ist, läßt sich als partielle Vergiftung des insulinspaltenden Enzyms durch das quecksilberhaltige Cialit deuten.

Erläuterungen zu Tabelle 8

α2M-Konzentration im Inkubationsgemisch: In allen Fällen 1600 µg/ml

Albuminkonzentration in den Leerwerten: 1000 µg/ml

Cialitkonzentration: 100 µg/ml

Inkubation in PO_4-Puffer (o,1m ; pH 7,4): 360 min bei 37°C

Tabelle 8 (Protokoll Nr.J22(14-18))

Insulinkonzentration im Inkubationsgemisch	% der zugefügten Radioaktivität im 2 x gewaschenen TCA-Präzipitat				%Radioaktivität durch α2M zerstört	
	α2M ohne Cialit	Albumin ohne Cialit	α2M mit Cialit	Albumin mit Cialit	α2M ohne Cialit	α2M mit Cialit
Trägerinsulin: 150 µg/ml 131J-Insulin: 0,5 µg/ml	81,5	91	90	93	9,5	3
Trägerinsulin: 10 µg/ml 131J-Insulin: 0,5 µg/ml	50,5	82	65	92	31,5	27
Trägerinsulin: -- 131J-Insulin: 1,75 µg/ml	41,5	92	53,5	95	50,5	41,5
Trägerinsulin: -- 131J-Insulin: o,175 µg/ml	42	89,5	55	100	47,5	45

6.3.6. Hemmung der Insulinspaltung durch Albumin

Aus Abbildung 27 geht hervor, daß der Abbau von Insulin in Gegenwart von Albumin verzögert abläuft, wobei das Ausmaß der Hemmung von der Albuminkonzentration abhängt.

Häufig wird das Insulin mit albuminhaltigen Pufferlösungen verdünnt, um Adsorptionseffekte zu

unterdrücken. Bei der Auswertung von Spaltungsversuchen, die mit solchen Insulinlösungen angesetzt wurden, muß man den hemmenden Einfluß des Albumins berücksichtigen.

Inkubation von Normal- oder Diabetikerserum bis zu 13 Stunden bei 37°C im Gemisch mit Insulin bewirkte keinen signifikanten Anstieg der TCA-löslichen Radioaktivität über das im Leerwert gefundene Maß hinaus. Auch dieser Befund läßt sich mit der Hemmwirkung des Albumins erklären. Sehr geringe insulinspaltende Aktivität scheint aber im Normalserum doch vorhanden zu sein: GJEDDE (1967) konnte nach sehr langer Inkubation einen Insulinabbau auch im Serum nachweisen.

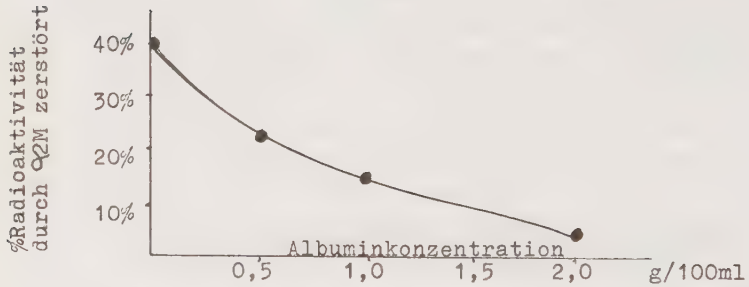


Abb.27 Hemmung der Insulinspaltung durch Humanalbumin (Protokoll Nr.J22)

α2M-Konzentration im Inkubationsgemisch: 1600 µg/ml

Insulinkonzentration im Inkubationsgemisch: 0,62 µg/ml (131J-Insulin ohne Trägerinsulin)

Inkubation in PO_4-Puffer (0,1 m ; pH 7,4) 310 min bei 37°C

7. Diskussion

7.1. Übersicht über die Literatur zu der Frage, in welcher Form das Insulin im Blut kreist

7.1.1. Allgemeines ; Begriffe und Definitionen

Trotz langjähriger Bemühungen zahlreicher Arbeitskreise in den verschiedensten Ländern ist die Frage bis heute nicht eindeutig zu beantworten, in welcher Form das Insulin im Blut kreist.

Einigkeit besteht bei allen Autoren darüber, daß der Wert, den man bei Bestimmung der Insulinaktivität im Serum erhält, entscheidend von der Meßmethode abhängt: Mit der immunologischen Bestimmungsmethode von BERSON und YALOW (1962) wurden im Serum von fastenden Normalpersonen Insulinkonzentrationen zwischen Null und maximal 120 Mikroeinheiten pro Milliliter gemessen (Übersicht bei JØRGENSEN 1969), während mit den biologischen Testmethoden (Rattenzwerchfell, Fettkörper, isolierte Fettzellen usw.) im gleichen Serum Werte von mehreren hundert bis zu einigen tausend Mikroeinheiten pro Milliliter gefunden wurden (vgl. BERSON und YALOW 1965 ; BERSON 1966).

Da bis heute unbekannt ist, ob biologische Testmethoden nur auf das im Serum kreisende Insulin, oder zusätzlich auch auf andere Serumbestandteile ansprechen, bezeichnet man die mit diesen Methoden gemessenen Aktivitäten ganz allgemein als insulinartige Aktivität ("Insulin-like activity") oder "ILA". Vergleiche hierzu und zum folgenden GJEDDE(1968), GLIEMANN(1965,1967a,1967b,1968) und LYNGSØE (1965,1967).

Fest steht lediglich, daß ein gewisser Teil der ILA durch frei im Plasma kreisendes Insulin dargestellt wird. Dieses freie Insulin ist nicht an höhermolekulare Plasmaproteine gebunden und weist die gleichen physikalischen Eigenschaften auf wie kristallisiertes Pankreasinsulin, das dem Plasma zugesetzt wird (BERSON et al.1956; BERSON und YALOW 1965; STEINKE und SOELDNER 1965). Es handelt sich dabei um diejenige Fraktion der ILA, die sowohl mit Insulinantikörpern reagiert, als auch bei der immunologischen Insulinbestimmung erfaßt wird. Sie wird von LYNGSØE(1965) als "immunreaktives Insulin" bezeichnet.

Die biologischen Wirkungen des immunreaktiven Insulins sind durch Insulinantikörper unterdrückbar. Deswegen wird es auch als hemmbare ILA ("suppressible ILA" FROESCH et al.1963) oder auch als typisches Insulin ("typical insulin" SAMAAN 1963) bezeichnet.

Es gibt Hinweise, daß immunreaktives Insulin und hemmbare ILA nicht in allen Fällen identisch

sind. Während das immunreaktive Insulin stets auch hemmbar ist, scheint es gewisse Formen der ILA zu geben, die bei bestimmten Prozeduren aus der nichthemmbaren ILA freigesetzt werden und die zwar mit Antikörpern hemmbar, nicht aber im Immunoassay fassbar sind. Nach LYNGSØE(1967) fallen diese Fraktionen der ILA unter den Begriff der hemmbaren ILA, nicht aber unter den Begriff des immunreaktiven Insulins.

Um Mißverständnisse zu vermeiden, sei darauf hingewiesen, daß in der Literatur zwar von nicht-immunreaktivem oder atypischem "Insulin" gesprochen wird, daß es aber keineswegs feststeht, ob es sich hier um Insulin in einer besonderen Zustandsform handelt. Auch in diesen Fällen wäre es daher besser, von nicht-immunreaktiver oder atypischer "ILA" zu sprechen.

7.1.2. Die Natur des endogenen nicht-immunreaktiven Insulins

Man hat versucht, die Natur des endogenen, nicht-immunreaktiven Insulins aufzuklären, indem man zunächst Serum in seine Bestandteile auftrennte und diese dann auf etwaige ILA prüfte.

BEIGELMAN et al.(1956) fanden in verschiedenen COHNschen Serumfraktionen insulinähnliche Aktivität. Viele Autoren verwendeten die präparative

Elektrophorese zur Auftrennung des Serums (TAYLOR 1958; RANDLE und TAYLOR 1958,1958a; BEIGELMAN 1958; TAYLOR und RANDLE 1959; BOLINGER et al.1959; VARGAS et al.1960; WILLEBRANDS 1960; GUNDERSEN und WILLIAMS 1960; LYNGSØE 1962,1963,1964; DITSCHUNEIT et al.1964; GLIEMANN 1965). Dabei stellte sich heraus, daß ILA sowohl im Albumin-Alpha-1-Bereich als auch im Beta-Gamma-Globulinbereich gefunden wird (Fraktion A und Fraktion B nach LYNGSØE). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen POWER et al.(1965a,1965b) nach Auftrennungdes Serums auf DEAE-Zellulose. Steinke und SOELDNER (1965) fanden nach Gelfiltration den größten Anteil der ILA zusammen mit Serumproteinen wieder, und das gleiche berichten ZAHND und SCHEIDEGGER (1964) von ihren Untersuchungen mit der Ultrazentrifuge.

Nach den Arbeiten der Gruppe um ANTONIADES (ANTONIADES et al.1958,1964,1965; ANTONIADES und GUNDERSEN 1962; SHAW und SHUEY 1963) läßt sich ein Teil der ILA mit einem Anionenaustauscher vom restlichen Serum abtrennen. ANTONIADES nimmt an, daß das Insulin an ein basisches Protein gebunden vorliegt. Dieser Insulin-Proteinkomplex (in der Literatur allgemein als "bound" oder "complexed" Insulin bezeichnet) läßt sich nach ANTONIADES vom Austauscherharz eluieren und in seine Bestandteile zerlegen. Die Befunde von ANTONIADES sind aber umstritten (MEADE et al.1968).

Auch durch Extraktion des Serums mit HCl-Alkohol oder mit TCA-Alkohol lassen sich Substanzen gewinnen, die eine ILA aufweisen (DAVIDSON et al.1963,1965).

Eine sehr weitgehende Isolierung und Charakterisierung von Serum-ILA gelang der Gruppe um BÜRGI und FROESCH (BÜRGI et al.1966; FROESCH et al.1966). Es handelt sich um eine Substanz mit einem Molekulargewicht zwischen 70 000 und 150000 und der elektrophoretischen Beweglichkeit eines Alpha- oder Beta-Globulins. Sie besitzt alle biologischen Eigenschaften des Insulins, aber es läßt sich nicht entscheiden, ob sie auch chemisch mit ihm verwandt ist.

7.1.3. Das Schicksal exogenen, dem Serum zugefügten Insulins

7.1.3.1. Allgemeines

Durch die in Abschnitt 7.1.2. zitierten Arbeiten ist heute zwar sichergestellt, daß bestimmte Serumfraktionen nichtimmunreaktives "Insulin" enthalten, aber es bleibt offen, ob es sich dabei überhaupt um Insulin (in einer besonderen Zustandsform) handelt , oder um eine vom Insulin völlig unabhängige Substanz, die lediglich biologische Eigenschaften mit diesem gemeinsam hat.

Viele Autoren haben daher einen anderen Weg eingeschlagen beim Versuch, die Frage zu lösen, in welcher Form das Insulin im Plasma kreist: Sie

mischen dem Blut Insulin bei und versuchen dann herauszufinden, wo und in welcher Form das zugefügte Insulin nachgewiesen werden kann.

Solche Untersuchungen haben bei Verwendung unmarkierten kristallinen Pankreasinsulins ergeben, daß dem Serum zugefügtes Insulin mit Hilfe des immunologischen Nachweises quantitativ wiedergefunden wird (YALOW und BERSON 1960; JØRGENSEN 1969). Unter den Bedingungen, die von diesen Autoren verwendet wurden, erfolgt also keine Umwandlung des zugefügten in nichtimmunreaktives Insulin.

7.1.3.2. Elektrophoretische Untersuchungen

Weitergehende Aufschlüsse über das Verhalten des Insulinmoleküls im Blut sind nur bei Verwendung markierten Insulins zu erwarten. Die elektrophoretische Auftrennung von Gemischen aus Serum und 131J-Insulin ergab übereinstimmend, daß ein Teil der Radioaktivität an verschiedene Serumproteine gebunden ist. In Tabelle 9 sind die Befunde aus der Literatur zusammengefaßt.

Durch Anwendung der Immunelektrophorese mit anschließender Autoradiographie und unter Zuhilfenahme spezifischer Antiseren ist immer wieder versucht worden, die Proteine näher zu charak-

Tabelle 9 Literatur zur elektrophoretischen Auftrennung von Gemischen aus Serum und 131J-Insulin

Autor	Fraktionierungs-methode	Radioaktivität gefunden in
BOLINGER et al. (1959)	Elektrophorese auf einer Stärke-gelsäule	Beta- und Gamma-Globulinfraktion
STEIGERWALD et al. (1960)	Agargelelektro-phorese	Albumin; $Alpha_1$-, $Alpha_2$- und Beta 2 Globulin-fraktion
PROUT (1961)	Immuno-elektrophorese	$Alpha_1$-Globulin-fraktion
DUNCOMBE und MANN (1962)	Papier-elektrophorese	$Alpha_2$-Globulin-fraktion
MITCHELL (1963)	Papier-elektrophorese	Alpha- und Beta-Globulinfraktion
STARZYNSKA (1967)	Immuno-elektrophorese	Albumin; $Alpha_2$-Globulinfraktion
HORINO et al. (1966)	Säulenelektropho-rese	4,5S-Proteine; 19 S-Proteine Meerschweinchenserum!

terisieren, an die die Radioaktivität gebunden wird. Bei diesen Untersuchungen wurde die Aufmerksamkeit immer wieder auf das α2M gelenkt. KALLEE und LOHSS wiesen bereits 1960 darauf hin, daß dieses Protein vermutlich insulinbindende Eigenschaften besitzt. Seither wurde diese Vermutung von einer ganzen Reihe von Autoren bestätigt (CLAUSEN et al.1963; KALLEE et al.1963b; ZAHND und SCHEIDEGGER 1963; KALLEE 1963; ZAHND und SCHEIDEGGER 1964; KRAML et al.1964; GEERLING und SIREK 1965; DEVLIN und O'DONOVAN 1965,1966; BERSON und YALOW 1965). Auch bei eigenen Untersuchungen gelang es, dieses Phänomen nachzuweisen.

7.1.3.3. Untersuchungen mit Ultrazentrifuge und Gelfiltration

Durch die im vorhergehenden Abschnitt zitierten Arbeiten ist zweifelsfrei sichergestellt, daß bei der elektrophoretischen Auftrennung von Gemischen aus Serum und 131J-Insulin ein Teil der Radioaktivität an Serumproteine, insbesondere auch an das α2M gebunden wird. Über die Deutung dieser Erscheinung bestehen aber große Meinungsverschiedenheiten. Zwei Argumente werden hauptsächlich angeführt, wenn die Beweiskraft der Befunde angezweifelt wird:

1. Man kann nicht ohne weiteres entscheiden, ob die Radioaktivität, die an ein bestimmtes Serumprotein gebunden wird, von intakten 131J-Insulinmolekülen herrührt oder von markierten Spaltprodukten stammt.
2. Die Bedingungen, denen das Serum-Insulingemisch bei der Elektrophorese unterworfen wird, sind unphysiologisch. Es kann sich bei Bindungsphänomenen, die unter solchen Bedingungen beobachtet werden, um reine Artefakte ohne jede Beziehung zum physiologischen Verhalten des Insulins handeln.

Ultrazentrifuge und Gelfiltration erlauben eine Auftrennung der Serum-Insulingemische unter physiologischeren Bedingungen als die Elektrophorese. Besonders in neueren Arbeiten werden diese schonenderen Techniken daher bevorzugt verwendet. Einige Ergebnisse sind in Tabelle 10 zusammengestellt:

Tabelle 10 Literatur zur Auftrennung von Gemischen aus Serum und 131J-Insulin mit Ultrazentrifuge und Gelfiltration

Autoren	Inkubationsbedingungen	Fraktionierungsmethode	Befunde
BERSON und YALOW (1962)	--	Ultrazentrifuge	Keine Unterschiede im Sedimentationsverhalten der Radioaktivität zwischen Gemischen aus 131J-Insulin und a)Normalserum, b)Veronalpuffer, c)Albuminlösung
CHAO et al.(1965)	1Std./4° oder 1Std./37°	Ultrazentrifuge	Keine Unterschiede im Sedimentationsverhalten der Radioaktivität zwischen Gemischen aus 131J-Insulin und a)Normalserum, b)physiol. Kochsalzlösung, c)Albuminlösung
CHAO et al.(1965)	1Std./4° oder 1Std./37°	Gelfiltration Sephadex G100	Kleiner Radioaktivitätsgipfel beim Proteingipfel
MERIMEE et al. (1965)	2Std./37° plus 12-24Std. bei 4°	Gelfiltration Sephadex G75	Untersuchung gereinigter Serumproteinfraktionen: Alle Proteinfraktionen binden geringe Mengen von Radioaktivität; Alpha-Globuline zeigen starke Radioaktivitätsbindung (aber nicht das α2M!)
GEERLING und SIREK (1965)	30min/37° plus einige Std. bei 4°	Präp. Ultrazentrifuge	Keine Änderung des Sedimentationsverhaltens der Radioaktivität nach multipler Verdünnung oder nach Zugabe von gereinigtem α2M.
DEVLIN und O'DONOVAN (1966)	20Std./4°	Gelfiltration Sephadex G200	Kleiner Radioaktivitätsgipfel im Makroglobulinbereich; in den übrigen Proteinfraktionen diffuse Verteilung geringer Radioaktivitätsmengen
TORO-GOYCO et al.(1966)	2Std./4°	Gelfiltration Sephadex G200	Proteinhaltige Fraktionen völlig frei von Radioaktivität

Autoren	Inkubationsbedingungen	Fraktionierungsmethode	Befunde
GJEDDE (1967)	Variabel	Gelfiltration Sephadex G200	Radioaktivität gebunden an folgende Globulinfraktionen: Alpha-2M; Beta-2M; Alpha-1. Versuchsergebnisse stark abhängig von den Inkubationsbedingungen!
FÖLDES et al.(1968)	1Std./37°	Gelfiltration Sephadex G100	Etwa 10% der Radioaktivität im Proteingipfel
		Gelfiltration Sephadex G200	Kleiner Radioaktivitätsgipfel bei den Makroglobulinen; etwas größerer Radioaktivitätsgipfel bei den 4S-Proteinen

Die in der Tabelle zusammengestellten Befunde stimmen nicht sehr gut überein. Jedoch fanden fast alle Autoren, die die Gelfiltration anwandten, eine wenn auch meist geringe Bindung von Radioaktivität an die Proteingipfel einschließlich der Makroglobulinfraktion. Die einzige Ausnahme macht TORO-GOYCO; das erklärt sich wahrscheinlich daraus, daß er das Inkubationsgemisch vor der Gelfiltration über eine Amberlite-Säule schickte.

Die Autoren, die das Sedimentationsverhalten der Radioaktivität in der Ultrazentrifuge untersuchten, fanden dagegen in keinem Fall Beweise für die Bindung von Radioaktivität an die Proteine. Vermutlich ist aber diese Methode nicht so empfindlich, daß sie den Nachweis einer Bindung gestattet, die in der Größenordnung von wenigen Prozenten liegt.

7.1.3.4. Untersuchungen mit der Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation ist eine weitere Methode zur Auftrennung von Serum-Insulingemischen unter physiologischen Bedingungen. Sofern genügend spezifische Antiseren zur Verfügung stehen, ist ihre Aussagekraft derjenigen aller anderen Methoden überlegen, da sie eine eindeutige Charakterisierung der jeweils untersuchten Proteinfraktionen gestattet. Trotzdem wurde sie bisher zur Klärung des Problems, ob eine Insulinbindung an Serumproteine stattfindet, nur von wenigen Autoren eingesetzt. In zwei Arbeiten wird speziell über die Untersuchung des α2M mit Hilfe dieser Methode berichtet:

GEERLING und SIREK(1965) fanden nach ziemlich kurzer Inkubationsdauer keine signifikante Insulinbindung an das α2M. GJEDDE(1967) fand dagegen, daß das Insulin in einer äußerst langsam, aber über einige Wochen mit konstanter Geschwindigkeit fortschreitenden Reaktion an das α2M gebunden wird.

Durch diesen Befund von GJEDDE, der in ähnlicher Weise auch in der vorliegenden Arbeit erhoben wurde, lassen sich viele Diskrepanzen zwischen den Ergebnissen der verschiedenen Autoren erklären. In fast allen Fällen wurden Inkubationszeiten gewählt, die im Verhältnis zum langsamen Ablauf der Reaktion als außerordentlich kurz gelten

müssen. Daher wurde meist entweder gar keine , oder nur eine ganz geringe Bindung beobachtet, die dann auch oft als unbedeutend bewertet wurde.

7.1.3.5. Untersuchungen mit gereinigtem α2M.

KEEHAN et al. versuchten zu prüfen, ob ein gereinigtes α2M-Präparat die Fähigkeit besitzt, Insulin zu binden: Weder die biologische Aktivität (ILA) noch die immunologisch meßbare Insulinkonzentration in einer insulinhaltigen Lösung wurden durch Zusatz von reinem α2M signifikant verändert. Die Autoren geben allerdings nicht an, wie lange das α2M-Insulingemisch inkubiert wurde. Das gereinigte α2M selber besaß keine mit biologischen Testmethoden nachweisbare ILA.

Die Autoren sind aufgrund ihrer Untersuchungen der Ansicht, daß das α2M nicht die Fähigkeit besitzt, Insulin zu binden. Dieser Schluß ist jedoch, wie sie selber schreiben, nicht zwingend. Denn es ist durchaus vorstellbar, daß das Insulin auch nach einer etwaigen Bindung an das α2M seine biologischen und immunologischen Wirkungen in vollem Umfang beibehält.

7.2. Eigene Ergebnisse

7.2.1. Insulinbindung durch α2M in Normalserum

Mit Hilfe einer immunologischen Testmethode kann nach Mischen von normalem Humanserum mit 131J-Insulin eine Bindung von Radioaktivität an das α2M nachgewiesen werden. Dabei ist kein Zusatz von unphysiologischen Puffern notwendig.

Die Bindungsreaktion läuft mit außergewöhnlich langsamer, aber über längere Zeiträume konstanter Geschwindigkeit ab (Abb.16). Infolgedessen geben die in den Versuchsreihen gemessenen "Bindungswerte" nicht Bindungskapazitäten an, sondern sie stellen ein Maß dar für die Geschwindigkeit, mit der die Bindung des Insulins an das α2M abläuft.

Formal läßt sich die Reaktion zwischen α2M (A) und Insulin (I) folgendermaßen schreiben:

$$(1) \quad A + I \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} AI$$

Dabei bedeuten k_1 die Geschwindigkeitskonstante der Bildungsreaktion des α2M-Insulinkoplexes (AI) und k_2 die Geschwindigkeitskonstante der Zerfallsreaktion des α2M-Insulinkomplexes (AI).

Die Reaktionsgeschwindigkeit steigt mit zunehmender Temperatur (Abb.15); sie ist innerhalb des untersuchten Konzentrationsbereiches direkt proportional zur Insulinkonzentration (Abb.18) und zur α2M-Konzentration (Abb.19) im Inkubationsgemisch. Die Kinetik der Gesamtreaktion entspricht also innerhalb des untersuchten Bereichs der Kinetik der Bildungsreaktion des α2M-Insulinkomplexes ($A + I \longrightarrow AI$), deren Geschwindigkeit v_1 durch folgende Gleichung beschrieben werden kann:

$$(2) \quad v_1 = k_1 \cdot [A] \cdot [I]$$

Die Zerfallsreaktion des Komplexes ($AI \longrightarrow A + I$), deren Geschwindigkeit durch die Gleichung

$$(3) \quad v_2 = k_2 \cdot [AI]$$

beschrieben werden kann, wirkt sich im untersuchten Bereich nicht merklich auf die Kinetik der Gesamtreaktion aus; im untersuchten Bereich überwiegt also die Bildungsreaktion bei weitem die Zerfallsreaktion.

Dieses Verhalten führt zunächst zu der Vermutung, daß die Geschwindigkeitskonstante k_2 viel kleiner ist als k_1. Das würde bedeuten, daß das Gleichgewicht der Gesamtreaktion (Gleichgewichtskonstante $K = k_1/k_2$) stark zugunsten des Komplexes verschoben ist. In diesem Fall müßte der Komplex AI sehr stabil sein, d.h. die Bindung zwischen Insulin und dem α2M wäre sehr fest und nur schwer reversibel.

Diese Schlußfolgerung ist allerdings nicht zwingend: Infolge der geringen Reaktionsgeschwindigkeit lagen bei den Versuchsreihen maximal 10% der Radioaktivität in gebundener Form vor (meist weniger). Selbst bei angenähert gleichen Geschwindigkeitskonstanten k_1 und k_2 wirkt sich unter solchen Verhältnissen die Spaltungsreaktion nur sehr wenig auf den Ablauf der Gesamtreaktion aus: Es werden in der Zeiteinheit viel mehr Komplexmoleküle gebildet als gleichzeitig zerfallen können. Die Befunde der Abbildungen 15 bis 19 widersprechen also nicht dem Ergebnis von GJEDDE (1967), daß die Bindung des Insulins an das α2M leicht reversibel ist.

Es sei hier ausdrücklich darauf hingewiesen, daß durch die Gleichung (1) nur das allereinfachste Modell angegeben ist, mit dem sich die Versuchsergebnisse zur Deckung bringen lassen. Die kinetischen Verhältnisse liegen in Wirklichkeit vermutlich komplizierter, als es in dieser Gleichung zum Ausdruck kommt. Insbesondere gestattet die Methode keine einfache Unterscheidung zwischen der Bindung von intakten 131J-Insulinmolekülen und von markierten Insulinspaltprodukten. Tatsächlich lassen sich die in den Abbildungen 15 bis 19 dargestellten Kurven genauso gut mit der Annahme deuten, daß ein gewisser Anteil der Radioaktivität zerstörtes Insulin repräsentiert und daß nur dieser Anteil vom α2M gebunden wird. Diese Deutung liegt besonders deswegen nahe, weil beim Normalserum die Bindungswerte alle in der gleichen

Größenordnung liegen, wie der nicht durch TCA fällbare Anteil der Radioaktivität in den 131J-Insulinpräparaten. Eine endgültige Entscheidung dieser Frage ist aufgrund der Versuchsergebnisse nicht möglich.

7.2.2. Bindung von Insulin durch das α2M in Patientenseren

Wie auch beim Normalserum geben die in Tabelle 4 angegebenen Bindungswerte von 19 Diabetikerseren nicht Bindungskapazitäten an, sondern sie stellen ein Maß dar für die Geschwindigkeit, mit der die Radioaktivität an das α2M des jeweiligen Serums gebunden wird . Die Werte schwanken in weiten Grenzen von 35 bis zu 490 Prozent der Norm. Der Durchschnittswert errechnet sich zu etwa 160% der Norm. Als mögliche Ursache für die starke Streuung der Werte kommt eine unterschiedliche Beladung der Seren mit körpereigenem oder körperfremdem injizierten Insulin in Frage.

7.2.3. Bindung von Insulin durch gereinigtes α2M

Werte der Bindung von Insulin an gereinigtes α2M gehen aus Tabelle 7 hervor. Ähnlich wie in Normalserum führt eine Verlängerung der Inkubationsdauer zu erhöhten Bindungswerten. Folglich ist auch hier die Sättigung des α2M mit Insulin nicht erreicht und die Werte geben deshalb nicht Bindungskapazitäten, sondern Bindungsgeschwindigkeiten an. Ferner steigt die Bindungsgeschwindigkeit in etwa linear mit der Insulinkonzentration an (Abb. 20 und 21). Sie nimmt auch mit der α2M-Konzentration zu, obwohl ein linearer Zusammenhang hier nicht bewiesen wurde. Bemerkenswerterweise fanden sich im Gegensatz zu Normalserum bei 4° und bei 37° etwa die gleichen Bindungswerte.

Die Frage, ob die gebundene Radioaktivität intaktes Insulin oder markierte Spaltprodukte repräsentiert, kann auch hier nicht direkt beantwortet werden. Jedoch lassen sich aus der Reaktionsgeschwindigkeit in der Kälte und in der Wärme gewisse Anhaltspunkte gewinnen:

Bei 4°C wurden bis zu 30% der Radioaktivität im Immunpräzipitat gefunden. Es ist nicht anzunehmen, daß im 131J-Insulin ein so hoher Prozentsatz an Abbauprodukten enthalten ist. Das Insulin wird bei dieser Temperatur innerhalb der Inkubationszeit durch das α2M auch nicht abgebaut.

Es bleibt nur der Schluß, daß die gebundene Radioaktivität intaktes Insulin darstellt.

Bei 37° dagegen wird das Insulin rasch zerstört und es treten reichlich Spaltprodukte auf. Dennoch fanden sich die gleichen Bindungswerte wie bei 4°C. Dieses gleichartige Verhalten bei verschiedenen Temperaturen läßt sich vielleicht durch die Annahme erklären, daß die Bindung von Radioaktivität bei 4°C ein qualitativ anderer Vorgang ist als bei 37°C: Bei 4°C werden intakte Insulinmoleküle gebunden, bei 37°C werden markierte Spaltprodukte und möglicherweise außerdem restliche intakte Insulinmoleküle gebunden. Demnach würde die Bindung intakter Moleküle bei 4°C gerade ebenso schnell ablaufen, wie die Bindung von Spaltprodukten bei 37°C.

Das unterschiedliche Verhalten von gereinigtem α2M und α2M im Serum paßt gut zu dieser Annahme: da α2M im Serum das Insulin nicht oder nur sehr langsam abbaut, gibt es im Serum bei 37° nicht mehr Insulinspaltprodukte als bei 4°C. Demzufolge läuft bei beiden Temperaturen der gleiche Vorgang - sei es die Bindung von intaktem Insulin oder die Bindung von markierten Spaltprodukten - ab, und dieser Bindungsprozeß ist temperaturabhängig.

7.2.4. Insulinspaltung durch gereinigtes α2M

Durch die gereinigten α2M-Präparate, welche für die vorliegende Arbeit verwendet wurden, wird das Insulin zerstört. Der Abbauvorgang

trägt alle Kennzeichen eines enzymatisch gesteuerten Prozesses, der mit stark reduzierter Geschwindigkeit abläuft.

Wie bereits in der Einleitung ausführlich dargestellt wurde, kann das α2M viele proteolytische Enzyme binden. In gebundenem Zustand besitzen diese Enzyme nicht mehr die Fähigkeit, großmolekulare Substrate anzugreifen, während kleinmolekulare Substrate mit fast unveränderter Geschwindigkeit abgebaut werden. Die sogenannte esterolytische Wirkung bleibt erhalten, während die proteolytische Aktivität verloren geht.

Offenbar werden durch die Bindung die sterischen Verhältnisse in der Umgebung der aktiven Zentren dieser Enzyme so verändert, daß nur noch Moleküle mit einer Ausdehnung unterhalb einer kritischen Grenze Zutritt finden. Nach GANROT (1967a) liegt zum Beispiel der polyvalente Proteasenhemmer aus bestimmten Geweben vom Rind mit einem Molekulargewicht von ca. 6500 nahe an dieser kritischen Grenze. Das Molekulargewicht von Insulin liegt in der gleichen Größenordnung. Demnach kann es an das aktive Zentrum solcher α2M-gebundener Proteasen gelangen, wenn auch nur unter einiger Behinderung. Ein weiterer hemmender Effekt dürfte darauf zurückzuführen sein, daß das Insulin bei pH 7,4 in aggregierter Form vorliegt (KLOSTERMEYER und HUMBEL 1966). Da es sich dabei immer um Gleichgewichte handelt, wird jedoch ein kleiner Teil des Insulins auch bei diesem pH als Monomeres vorliegen, das

allein an das Enzym herankommen kann. Aber die Konzentration dieser "aktiven" Form des Insulins ist sehr gering, wodurch die Reaktionsgeschwindigkeit abnehmen muß.

Mit großer Wahrscheinlichkeit enthielt also das α2M-Standardpräparat trotz der Reinigung noch eines der im Blut vorhandenen proteolytischen Enzyme (Plasmin oder Thrombin, vgl. SZCZEKLIK 1969). Durch diese Annahme werden die eigenen Befunde erklärt und sie steht auch im Einklang mit Angaben in der Literatur, daß α2M-Präparate nach ihrer Isolierung aus dem Serum noch proteolytische oder esterolytische Aktivitäten aufwiesen (STEINBUCH et al.1965 ; MEHL et al.1966).

7.3. Die Bedeutung der Befunde im Hinblick auf die Verhältnisse in vivo

Durch die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen lassen sich bis zu einem gewissen Grad die widersprüchlichen Meinungen erklären, die in der Literatur zu der Frage vertreten werden, ob Insulin durch α2M gebunden wird: In Gemischen aus Serum und 131J-Insulin wird ein Teil der Radioaktivität an das α2M gebunden, aber mit so geringer Geschwindigkeit, daß dieser Bindungs-

prozeß meist übersehen oder als unbedeutend bewertet wurde.

Das gilt vor allem für jene Autoren, welche mit relativ kurzen Inkubationszeiten arbeiten und die ihre Serum-Insulingemische mit Hilfe der Ultrazentrifuge oder der Gelfiltration auftrennen. Bei der Immunelektrophorese dagegen handelt es sich um eine sehr empfindliche Methode: Auch wenn nur geringe Bruchteile der Radioaktivität an die α2M-Sichel gebunden sind, läßt sich in der anschließenden Autoradiographie eine Schwärzung der Sichel sichtbar machen. Alle Autoren, die mit dieser Methode arbeiteten, fanden demnach übereinstimmend eine Bindung von Radioaktivität an das α2M. Allerdings ist die Aussagefähigkeit elektrophoretischer Untersuchungen infolge der unphysiologischen Versuchsbedingungen eingeschränkt.

Bei den hier beschriebenen Untersuchungen mit der Immunpräzipitation nach KALLEE handelt es sich um in vitro Experimente. Die Verhältnisse im Inkubationsgemisch waren jedoch weitgehend physiologisch. Wahrscheinlich können die beobachteten Bindungsphänomene daher auch in vivo auftreten.

Vermutlich besteht ein Zusammenhang zwischen dem Vermögen des α2M, im Serum kreisende Proteasen zu binden und seiner Fähigkeit, im Gemisch mit ^{131}J-Insulin einen Teil der Radioaktivität aufzunehmen. Möglicherweise wird das Insulin nicht direkt an das α2M angelagert , sondern

im Sinne der Bildung eines Enzym-Substratkomplexes an die am α2M haftenden Enzyme. Dort bleibt es entweder unverändert (gereinigtes α2M in der Kälte) oder es wird enzymatisch abgebaut. Die Spaltprodukte dissoziieren teilweise ab, teilweise bleiben sie am α2M-Proteasenkomplex gebunden. Der ganze Vorgang läuft infolge der sterischen Verhältnisse und insbesondere in der Gegenwart von Albumin stark verlangsamt ab (S.68, S.87), womit die geringe Bindungsgeschwindigkeit im Serum erklärt ist.

Die TOMIZAWA-Methode ist nicht empfindlich genug, um einen Anstieg der TCA-löslichen Radioaktivität um wenige Prozent über das im Leerwert gefundene Maß hinaus eindeutig zu erfassen. Daher war ein signifikanter Nachweis der Spaltprodukte im Serum bei den hier verwendeten Inkubationszeiten nicht möglich (DÜRR und KALLEE 1967). Jedoch fand GJEDDE (1967) in Gemischen aus Serum und 125J-Insulin bei wesentlich längerer Inkubation einen etwa parallelen Anstieg von α2M-gebundener und TCA-löslicher Radioaktivität. GJEDDE (1967) untersuchte auch die radioaktiven Spaltprodukte, welche nach 21-tägiger Inkubation von Gemischen aus Serum und 125J-Insulin durch Dialysiermembranen hindurchtraten. Er fand, daß sie von Serumproteinen nicht gebunden werden. Dies ist nach der oben entwickelten Theorie gut verständlich, da nur diejenigen Insulinspaltprodukte den Dialysierschlauch passieren können, welche nicht vom α2M-Proteasenkomplex festgehalten werden.

Im Normalfall sind wahrscheinlich nur Plasmin und Thrombin an das α2M gebunden (SZCZEKLIK 1969). Es ist jedoch denkbar, daß bei Diabetikern gelegentlich auch Trypsin ins Blut gelangt. So könnte es zu unterschiedlicher Beladung des α2M mit Proteasen kommen, was wiederum zu unterschiedlicher Aktivität des α2M dem Insulin gegenüber führen müßte. Durch diesen Mechanismus ist eine weitere Erklärung für die starke Streuung der Bindungswerte bei den Patientenseren gegeben.

Bei dem geringen quantitativen Ausmaß der hier beobachteten Bindungsphänomene ist es sehr fraglich, ob ihnen eine physiologische Bedeutung zukommt. Vermutlich sind sie als Vorgänge unspezifischer Natur im oben angegebenen Sinn zu deuten. Jedenfalls läßt sich die Auffassung, daß das α2M als spezifisches Trägerprotein für Insulin dient, durch die hier erhobenen Befunde nicht stützen.

Zusammenfassung

1. Mit Hilfe der quantitatven Immunpräzipitation wurden in verschiedenen Humanseren folgende α2-Makroglobulin(=α2M)-Konzentrationen gemessen:

Normalserum:	225 mg/100ml
19 Diabetikerseren:	Schwankende Werte; im Durchschnitt Erhöhung auf 133% der Norm
Analbuminämieserum:	675 mg/100ml

Die Befunde stehen in guter Übereinstimmung mit den Angaben der Literatur.

2. Ebenfalls auf immunologischem Weg wurde die Bindung von 131J-Insulin an das α2M untersucht.

In Normalserum wird die Radioaktivität in einem sehr langsam, aber über große Zeiträume mit konstanter Geschwindigkeit fortschreitenden Prozeß an das α2M gebunden. Der Bindungsprozeß ist temperaturabhängig. Seine Geschwindigkeit steigt linear mit der Insulinkonzentration und mit der α2M-Konzentration.

In 19 Diabetikerseren fanden sich stark schwankende Werte (zwischen 35 und 490 Prozent der Norm).

Bei gereinigtem α2M fanden sich bei 4°C und bei 37°C die gleichen Bindungswerte. Vermutlich werden

in der Kälte ausschließlich Insulinmoleküle gebunden, in der Wärme dagegen außerdem noch Insulinspaltprodukte.

3. Die Spaltung von Insulin durch ein gereinigtes α_2M-Präparat wurde untersucht. Es handelt sich um einen Prozeß mit allen Kennzeichen eines langsam ablaufenden enzymatischen Abbauvorgangs.

Literaturverzeichnis

ADHAM,N.F. ; WILDING,P. ; MEHL,J. und HAVERBACK,B.J.

Alpha-2-macroglobulin levels in human sera. The effect of sex and estrogen. The role of α2M as a carrier protein for insulin.
J. Lab. Clin. Med 71 (1968) 271

ALY,F.W. ; BRAUN,H.J. ; HADAM,W.R. und KALLEE,E.

Zur Bedeutung der Eiweißvehikelfunktion.
Bericht über ein Internationales Symposion am 13./14. Sept. 1968 in Tübingen zum 75. Geburtstag von Prof. Dr. H.H.Bennhold. Tagungsleitung H.E.Bock.
Z. Arzneimittelforsch. 18 (1968) 1467

AMBROSIUS,H. und LEHMANN,R.

Eine Methode zur quantitativen Bestimmung von Immunpräzipitaten bis zu 1µg Protein.
Clin. Chim. Acta 18 (1967) 279

ANTONIADES,H.N. ; BEIGELMANN,P.M. ; PENNELL,R.B. ; THORN,W. und ONCLEY,J.L.

Insulin-like activity of human plasma constituents. III. Elution of ILA from cationic exchange resin.
Metabolism 7 (1958) 266

ANTONIADES,H.N. und GUNDERSEN,K.

Materials and methods for the estimation of "free" and "bound" insulin-like activity in serum.
Endocrinology 70 (1962) 95

ANTONIADES,H.N. ; BOUGAS,J.A. ; CAMERINI-DAVALOS,R. und PYLE,H-M.

Insulin regulatory mechanisms and diabetes mellitus.
Diabetes 13 (1964) 230

ANTONIADES,H.N. ; HUBER,A.M. ; BOSHELL,B.R. ; SARAVIS,C.A. und GERSHOFF,S.N.

Properties of circulating "free" and "bound" insulin.
Endocrinology 76 (1965) 709

BEIGELMANN,P.M.

Insulin-like activity of serum protein fractions.
Diabetes 7 (1958) 365

BEIGELMANN,P.M. ; ANTONIADES,H.N. ; GOETZ,F.C. ; RENOLD,A.E. ; ONCLEY,J.L. und THORN,G.W.

Insulin-like activity of human plasma constituents. II.Biologic assay of human plasma fractions for insulin-like activity.
Metabolism 5 (1956) 44

BERSON,S.A. ; YALOW,R.S. ; BAUMAN,A. ; ROTHSCHILD,M.A. und NEWERLY,K.

Insulin J131 metabolism in human subjects. Demonstration of insulin binding globulin in the circulation of insulin treated subjects.
J. Clin. Invest. 35 (1956) 170

BERSON,S.A. und YALOW,R.S.

Immunoassay of plasma insulin.
Ciba Found. Coll. Endocr. vol.14 (1962) p.182 (Churchill, London)

BERSON,S.A. und YALOW,R.S.

Some current controversies in diabetic research.
Diabetes 14 (1965) 549

BERSON,S.A. und YALOW,R.S.

Insulin in blood and insulin antibodies.
Amer. J. Med. 40 (1966) 676

BIETH,J. ; METAIS,P. und WARTER,J.

Activation, inhibition and protection of tryptic and α-chymotryptic activity by normal human serum.
Clin. Chim. Acta 20 (1968) 69

BOFFA,G.A. ; NADAL C. ; ZAJDELA,F. und FINE,J.M.

Slow α2-globulin of rat serum.
Nature 203 (1964) 1182

BOFFA,G. ; JACQUOT-ARMAND,Y. ; GAUDIN-HARDING,F. ; SUSBIELLE,H. und FINE,J.M.

Serum α2-macroglobulin in rats; detection during pregnancy. (Zitiert nach Chem. Abstr. 64 (1966) 11632h)
Compt. Rendu Soc. Biol. ,Paris 159 (1965) 1307

BOFFA,G. ; FINE,J.M. ; JACQUOT-ARMAND,Y. ; GAUDIN-HARDING,F. und SUSBIELLE,F.

Existence of α1- and α2-macroglobulin in fetal and neonatal rat serum. (Zit. Chem. Abstr. 64 (1966) 11632h)
Compt. Rendu Soc. Biol. Paris 159 (1965)1342

BOLINGER, R.E. ; VAN DER GELD,H. ; WILLEBRANDS,A.F.

Electrophoretic separation of insulin activity of normal plasma and plasma with added insulin-J131. Metabolism 8 (1959) 39

BOURRILLON,R. ; RAZAFIMAHALEO,E. und PARNAUDEAU,M.A.
Etudes sur la structure de l'α2 macroglobulin humaine (α2M). II.Preparation et propriétés des glycopeptides isolés d'un hydrolysat enzymatique d'α2M.
Biochim. Biophys. Acta 154 (1968) 405

BOYDE,T.R.C. und PRYME,I.F.

α2M binding of trypsin, chymotrypsin, papain and cationic aspartate aminotransferase.
(Clin. Chim. Acta 21 (1968) 9

BROWN,R.K. ; BAKER,W.H. ; PETERKOFSKY,A. und KAUFFMAN,D.L.

Crystallization and properties of a glycoprotein isolated from human plasma.
J. Amer. Chem. Soc. 76 (1954) 4244

BÜRGI,H. ; MÜLLER,W.A. ; HUMBEL,R.E. ; LABHART,A. und FROESCH,E.R.

Non-suppressible insulin-like activity of human serum. I.Physicochemical properties, extraction and partial purification.
Biochim. Biophys. Acta 121 (1966) 349

CHAO,P.Y. ; KARAM,J.H. und GRODSKY,G.M.

Insulin J131 binding in serum from normal and diabetic subjects by ultracentrifugation and gel filtration.
Diabetes 14 (1965) 27

CLAUSEN,J. ; GJEDDE,F. und JOERGENSEN,K.

Insulin binding proteins in human serum.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 112 (1963) 778

CLEVE,H. ; ALEXANDER,K. ; MITZKAT,H.J. ; NISSEN,P. und SALZMANN,I.

Serumglykoproteine beim Diabetes mellitus; quantitative immunologische Bestimmung von saurem α1-Glykoprotein, Gc, α2-Makroglobulin und Hemopexin bei Diabetikern mit und ohne Angiopathien.
Diabetologia 4 (1968) 48

COLLIPP,P.J. ; KAPLAN,S.A. ; BOYLE,D.C. und SHIMIZU,C.S.N

Protein bound human growth hormon.
Metabolism 13 (1964) 532

DAVIDSON,J.K. ; HAIST,R.E. und BEST,C.H.

Studies employing a new method for the recovery of biologically active insulin from acid alcoholic extracts of pancreas and blood serum.
Diabetes 12 (1963) 448

DAVIDSON,J.K. ; HAZLETT,B. und HAIST,R.E.

Serum insulin activity levels in normal and diabetic human subjects (Abstract).
Diabetes 14 (1965) 453

DEMAILLE,J. ; DAUTREVAUX,M. ; HAVEZ,R. und BISERTE,G.

Isolement, propriétés physico-chimiques et composition de l'α2-macroglobulin de porc.
Bull. Soc. Chim. France 1965(2) 3506

DEVLIN,J.G. und O'DONOVAN,D.K.

The association of acute local reactions to insulin with an insulin binding gamma I.M. antibody.
J. Clin. Path. 18 (1965) 356

DEVLIN,J.G. und O'DONOVAN,D.K.

Preferential beef/pork insulin-binding capacity. Radioimmunoelectrophoretic and chromatographic data in patients with dermal reactions to insulin.
Diabetes 15 (1966) 790

DITSCHUNEIT,H. ; CUENDET,R. und PFEIFFER,E.F.

Activité insulinique des fractions protéiniques du sérum humain normal.
Path. Biol. (Paris) 12 (1964) 148

DITZEL,J. und MOINAT,P.

Changes in serum proteins, lipoproteins, and protein-bound carbohydrates in relation to pathologic alterations in the microcirculation of diabetic patients.
J. Lab. Clin. Med. 54 (1959) 843

DUNCOMBE,W.G. und MANN,C.B.

Interaction of normal human serum with 131J-Insulin.
Biochim. Biophys. Acta 56 (1962) 193

DUNN,J.T. und SPIRO,R.G.(1967a)

The α2M of human plasma. I.Isolation and composition.
J. Biol. Chem. 242 (1967) 5549

DUNN,J.T. und SPIRO,R.G. (1967b)

The α2M of human plasma. II.Studies on the carbohydrate units.
J. Biol. Chem. 141 (1967) 5556

DÜRR,H.K. und KALLEE,E.

Spaltung von 131J-Rinderinsulin durch reines α2-Makroglobulin .
Z. Naturforsch. 22b (1967) 793

DYCE,B. ; WONG,T. ; ADHAM,N.F. ; MEHL,J. und HAVERBACK,B.J.

Human plasma kallikrein esterase associated with the α2M binding protein.
Clin. Res. 14 (1967) 101

EJARQUE,P. ; MARBLE,A. und TULLER,E.F.

Proteins, lipoproteins and protein-bound carbohydrates in the serum of diabetic patients.
Amer. J. Med. 27 (1959) 221

FILITTI-WURMSER,S. und HARTMANN,L. (1962a)

Separation of the macroglobulins from human serums by ultracentrifugation on a trapping solvent (density gradient barrier). Zitiert nach
Chem. Abstr. 58 (1963) 1585g)
Bull. Soc. Chim. Biol. Paris 44 (1962) 725

FILITTI-WURMSER,S. und HARTMANN,L. (1962b)

Physicochemical studies of purified macroglobulins and normal and pathological human serums.
(Zitiert nach Chem. Abstr. 58 (1963) 3774h)
Bull. Soc. Chim. Biol. Paris 44 (1962) 919

FÖLDES,J. ; PIROSKA,E. und TAMAS,G.

Determination of the 125J-insulin-plasma complex by gel filtration.
Acta Diabetologica Latina (Casa Editrice "Il Ponte", Milano) 5 (1968) 347

FROESCH,E.R. ; BÜRGI,H. ; RAMSEIER,E.B. ; BALLY,P. und LABHART,A.

Antibody suppressible and nonsuppressible insulin-like activity in human serum and their physiologic significance. An insulin assay with adipose tissue of increased precision and specifity.
J. Clin. Invest. 42 (1963) 1816

FROESCH,E.R. ; MÜLLER,W.A. ; BÜRGI,H. ; WALDVOGEL,M. und LABHART,A.

Non-suppressible insulin-like activity of human serum. II.Biological properties of plasma extracts with non-suppressible insulin-like activity.
Biochim. Biophys. Acta 121 (1966) 360

GANS,H. und TAN,B.H.

α1 antitrypsin, an inhibitor for thrombin and plasmin.
Clin. Chim. Acta 17 (1967) 111

GANROT,P.O. (1966a)

Determination of α2-macroglobulin as trypsin protein esterase.
Clin. Chim. Acta 14 (1966) 493

GANROT,P.O. (1966b)

α2-Antitrypsin activity and different trypsin substrates.
Clin. Chim. Acta 13 (1966) 518

GANROT,P.O. (1967a)

Studies on serum protease inhibitors with special reference to α2-macroglobulin.
Acta Univ. Lund., Sect.II No,2 (1967)

GANROT,P.O. (1967b)

Inhibition of plasmin activity by α2-macroglobulin.
Clin. Chim. Acta 16 (1967) 328

GANROT,P.O.

Variation of the α2M-homolog with age in some mammals.
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 21 (1968) 177

GANROT,P.O. ; GYDELL,K. und EKELUND,H.

Serum concentration of α2-macroglobulin, haptoglobin and α1-antitrypsin in diabetes mellitus.
Acta Endcr. (Kobenhavn) 55 (1967) 537

GANROT,P.O. und LAURELL,C.B.

Electrophoretic heterogenity of α2-macroglobulin
Clin. Chim. Acta 14 (1966) 137

GANROT,P.O. und NILEHN,J.E.

Competition between plasmin and thrombin for α2-maccroglobulin.
Clin. Chim. Acta 17 ; (1967) 511

GANROT,P.O. und SCHERSTEN,B.

Serum α2-macroglobulin concentration and its variation with age and sex.
Clin. Chim. Acta 15 (1967) 113

GEERLING,H. und SIREK,O.V.

Alpha-2 macroglobulin and the question of a protein carrier for insulin in human serum.
Canad. J. Physiol. Pharmacol. 43 (1965) 885

GENTOU,C.

Quaternery structure of normal human α2-macro-globulin (Zitiert nach Chem. Abstr, 69(1968)49206k)
C.R. Acad. Sci. Paris, Ser..D 266 (1968) 2358

GJEDDE,F.

Insulin binding proteins in normal human serum. The in vitro association of homologous 125J-labelled insulin and normal serum proteins. Acta physiol. Scand. 70 (1967) 69

GJEDDE,F.

Studies in the insulin-like activity of serum. I.Normal values determined by the rat epididymal fat pad and by the rat diaphragm method. Acta Endocr. (Kobenhavn) 57 (1968) 330

GLIEMANN,J.

Insulin-like activity of dilute human serum assayed by an isolated adipose cell method. Diabetes 14 (1965) 643

GLIEMANN (1967a)

Assay of insulin-like activity by the isolated fat cell method. I.Factors influencing the response to crystalline insulin. Diabetologia 3 (1967) 382

GLIEMANN,J. (1967b)

Assay of insulin-like activity by the isolated fat cell method. II.The suppressible and non-suppressible insulin-like activity of serum. Diabetologia 3 (1967) 389

GLIEMANN,J.

Assay of insulin-like activity by the isolated fat cell method III.Studies on the non-suppressible insulin-like activity of serum. Diabetologia 4 (1968) 95

GÖBEL,P. und KALLEE,E.

Vergeichende Bestimmung des Insulinantikörperspiegels. 14. Symposion der Deutsch. Ges. f. Endocrinologie über "Nebenschilddrüse und endokrine Regulation des Calciumstoffwechsels ; Spontanhypoglykämie ; Glucagon" Heidelberg 7.-9.3.1968. Springer, Berlin 1968, S.178

GOT,R. ; MOURAY,H. und MORETTI,J.

Etude biochimique de la macroglobuline du sérum de lapin. I. Préparation et propriétés physico-chimiques. Biochim. Biophys. Acta 107 (1965) 278

GOT,R. ; CHEFTEL,R.I. ; FONT,J. und MORETTI,J.

Etude biochimique de l'α1 macroglobuline du sérum de lapin. III.Biochimie de la copule glucidique. Biochim. Biophys. Acta 136 (1967) 320

GUNDERSEN,K. und WILLIAMS,R.H.

Insulin antagonism in serum of untreated diabetics and in previously treated diabetics with keto-acidosis. Proc. Soc. Exp. Biol. 105 (1960) 390

HADDEN,D.R. und PROUT,T.E.

A growth hormone binding protein in normal human serum. Nature 202 (1964) 1342

HARTMANN,L. ; LAGRUE,G. und MORETTI,J.

Confrontation du syndrome néphrotique et de la protéinurie lordotique. Etudes physiques et immunol logiques des protéines sériques et urinaires. Rev. Franc. Etud. Clin. Biol. 3 (1958) 1052

HAVERBACK,B.J. ; DYCE,B. ; BUNDY,H.F. ; WIRTSCHAFTER,S.K. und EDMONDSON,H.A.

Protein binding of pancreatic proteolytic enzymes. J. Clin. Invest. 41 (1962) 972

HEIMBURGER,N. und HAUPT,H.

Zur Spezifität der Antiproteinasen des Humanplasmas für Elastase. Klin. Wschr. 44 (1966) 1196

HEINZEL,W.

Ein neues Verfahren zur quantitativen Eiweißbestimmung. Verh. Deutsch, Ges. Inn. Med. 66 (1960) 636

HEINZEL,W. ; VOGT,A. ; KALLEE,E. und FALLER,W.

A new method for the quantitative determination of antibody and antigen protein with a sensitivity to five micrograms. J. Lab. Clin. Med. 66 (1965) 334

HITZIG,W.H.

Das Bluteiweißbild im Säuglingsalter Bull. Schweiz. Akad. Med. Wiss. 17 (1961) 228

HORINO,M. ; YU,S.Y. und BLUMENTHAL,H.T.

Studies on experimental insulin immunity. I. Dynamics of insulin immunity in the guinea pig. Diabetes 15 (1966) 812

HOWARD,S.M.

Trypsin binding α2 macroglobulin of human plasma. Doctoral Dissertation, University of Southern California, Los Angeles 1966

HOUSLEY,J. ; JONES,L. und HARVEY,A.

Serum α-macroglobulin in rat aminonucleoside nephrosis. Clin. Chim. Acta 21 (1968) 85

JACQUOT-ARMAND,Y.

Comparative binding of α2-macroglobulin and different inhibitors to trypsin.
(Zitiert nach Chem. Abstr. 67 (1967) 40436m).
C.R. Acad. Sci. Paris, Ser.D 264 (1967) 2236

JACQUOT-ARMAND,Y. ; BOFFA,G. und FINE,J.M.

Isolement d'une macroglobuline-α1 (α1M) dans le sérum du rat normal.
Compt. Rendu 255 (1962) 590

JACQUOT-ARMAND,Y. und GUINAND,S.

Composition et structure de l'α2 macroglobuline isolée du sérum de porc.
Biochim. Biophys. Acta 133 (1967) 289

JACQUOT-ARMAND,Y. ; PERY,M. und GUINAND,S.

Isolement et propriétés physicochimiques d'α2-macroglobuline du sérum de porc.
Compt. Rendu 260 (1965) 6223

JAMES,K. ; JOHNSON,G. und FUDENBERG,H.H. (1966a)

The quantitative estimation of α2-macroglobulin in normal and pathological cord sera.
Clin. Chim. Acta 14 (1966) 207

JAMES,K. ; TAYLOR jr.,F.B. und FUDENBERG,J.H. (1966b)

Trypsin stabilizers in human serum. The role of α2M.
Clin. Chim. Acta 13 (1966) 359

JAMES,K. ; TAYLOR jr.,F.B. und FUDENBERG,H.H.

The effect of α2M in human serum on trypsin, plasmin and thrombin activities.
Biochim. Biophys. Acta 133 (1967) 374

JØRGENSEN,K.R.

Evaluation of the double antibody radioimmunoassay of insulin and the determination of insulin in plasma and urine in normal subjects.
Acta Endocr. (Kobenhavn) 60 (1969) 327

JONSSON,A. ; GOA,J. ; FAGERBERG,S.E. und HOOD,B.

Seromucoid fraction, serum proteins and lipids in diabetes mellitus.
Acta Med. Scand. 174 (1963) 701

KABAT,E.A. und MAYER,M.M.

Experimental Immunochemistry Springfield (Ill.)1962

KALLEE,E. und LOHSS,F.

Diskussionsbemerkung zu H.MILLER und G.OWEN in "Radioaktive Isotope in Klinik und Forschung" Band 4 (1960), S.275 (Urban & Schwarzenberg, München)

KALLEE,E.

Diskussionsbemerkung zu G.R.ZAHND und J.J.SCHEIDEGGER
Helv. Med. Acta 30 (1963) 510

KALLEE,E. ; LANG,G. und HEINZEL,W. (1963a)

Neuer quantitativer Nachweis der leichtreversiblen Adsorption an Proteine. 1.Bindung von Bromphenolblau und 131J-Trijodthyronin an Humanalbumin und Humanserum.
Acta isotop. (Padova) 3 (1963) 303

KALLEE,E. ; DEBIASI,S. und D'ADABBO,A. (1963b)

Studies on 131J-labeled insulin. VI.-Immunological experiments on the binding of 131J-Insulin to serum proteins of normal, analbuminaemic and insulin-treated subjects.
Acta isotopica (Padova) 3 (1963) 239

KEEHAN,M.F. ; SMITH,M.J. ; HOWARD,S.M. ; MEHL, J.W. und BEIGELMAN,P.M.

Absence of insulin-like or insulin-binding action of α2-macroglobulin.
Clin. Chim. Acta 16 (1967) 215

KLOSTERMEYER,H. und HUMBEL,E.

Chemie und Biochemie des Insulins
Angew. Chemie 78 (1966) 871

KLUTHE,R. ; KLEINE,N. und HAGEMANN,U.

Bestimmung des α2-Makroglobulinumsatzes beim Menschen
Experientia 22 (1966) 385

KNIGHT,K.L. und DRAY,S.

Identification and genetic control of two rabbit α2-macroglobulin allotypes.
Biochemistry 7 (1968) 1165

KRAML,J. ; PROKEŠ,J. ; PELICHOVÁ,H. ; CHMELAŘ,M. und KACL,K.

The immunoelectrophoretic assay of insulin-131J interaction with human α2M in vitro. Folia microbiologica (Praha) 9 (1964) 121

LANCHANTIN,G.F. ; PLESSET,M.L. ; FRIEDMANN,J.A. und HART,D.W.

Dissociation of esterolytic and clotting activities of thrombin by trypsin-binding macroglobulin. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 121 (1966) 444

LARSSON,Y. und STERKY,G.

Long-term prognosis in iuvenile diabetes mellitus. Acta paediat. Scand., suppl. 130 (1962)

LAURITSEN,O.S.

Some observations on the caseinolytic properties of a purified, activator-free porcine plasmin preparation. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 18 (1966) 64

LYNGSØE,J.

The insulin-like activity in serum determined by the rat epididymal fat method. III.Insulin antagonism in serum from normal persons and diabetics, including some observations on pig's blood. Acta med. Scand. 172 (1962) 601

LYNGSØE,J.

The insulin-like activity in serum determined by the rat epididymal fat method. IV.Anti-insulin inhibition of insulin-like activity in electrophoretically separated serum protein fractions. Acta med. Scand. 174 (1963) 589

LYNGSØE,J.

The insulin-like activity in serum determined by the rat epididymal fat method. V.The distribution of insulin-like activity in electrophoretically-separated serum protein fractions from normal fasting subjects and the effect of ingestion of glucose. Acta med. Scand. 175 (1964) 401

LYNGSØE,J.

Serum insulin. A review. Acta med. Scand. , suppl. 441 (1965)

LYNGSØE,J.

The state of insulin in plasma. Acta med. Scand. , suppl. 476 (1967)

MARIMEE,T,J. ; LOCKWOOD,D.H. und PROUT,T.E.

The relationship of 131J-Insulin to serum protein fractions.
Bull. Hopkins Hosp. 116 (1965) 191

MEADE,R.C. ; BRUSH,J.S. und KLITGAARD,H.M.

Failure to demonstrate "bound" insulin in human serum.
Diabetes 17 (1968) 369

MEHL,J.W. ; O'CONNELL,W. und DE GROOT,J.

Macroglobulin from human plasma which forms an enzymatically active compound with trypsin.
Science 145 (1964) 821

MEHL,J.W. ; PARK,M.Y. und o'CONNELL,W.

Separation of trypsin inhibitors of human plasma on DEAE-cellulose.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 122 (1966) 203

MICHALSKI,R. ; NAGEL,W. und ROBEL,K.P.

Wirkung von Trypsininhibitoren auf proteingebundenes Trypsin.
Naturwissenschaften 53 (1966) 614

MITCHELL,M.L.

Abnormal insulin-binding fraction demonstrated by electrophoresis on ion exchange paper of sera from diabetic patients.
J. Clin. Endocr. 20 (1960) 1319

MITCHELL,M.L.

Interaction of radioinsulin with serum proteins in vitro and with liver in vivo among diabetic and nondiabetic patients. J.Clin.Endocr. 23(1963)1001

MOURAY,H. ; GOT,R. und MORETTI,J.

Etude biochimique de l'α1-macroglobuline du sérum de lapin. III.Metabolism.
Biochim. Biophys. Acta 107 (1965) 286

MÜLLER-EBERHARD und KUNKEL,H.G.

Carbohydrate of γ-globulin and myeloma proteins
J. Exp. Med. 104 (1956) 253

MÜLLER-EBERHARD,H.J. ; KUNKEL,H.G. und FRANKLIN,E.C.

Two types of γ-globulin differing in carbohydrate content.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 93 (1956) 146

NORBERG,R.

Carbohydrate content of normal 19S globulins.
Clin. Chim. Acta 9 (1964) 89

PETERKOFSKY,A. ; LEVINE,L. und BROWN,R.K.

Quantitative estimation of antigens by complement fixation. Studies on the heat-labile alpha-2 glycoprotein.
J.Immunol. 76 (1956) 237

POWER,L. ; LUCAS,C. und CONN,J.W.

Further studies on insulin augmentation capacities of various serum proteins.
Metabolism 14 (1965) 845

POWER,L. ; RAYES-LEAL,B. ; CONN,J.W. und ARBOR,A.

A comparison of insulin-like activity contained in the serum proteins of normal subjects and diabetic patients.
Diabetes 14 (1965) 71

PROUT,T.E. ; ODAK,V.V. und DENDRINOS,G.J.

The role of alpha globulin as insulin-carrying protein in human serum (Abstract).
J. Clin. Invest. 40 (1961) 1073

PROUT,T.E. ; ODAK,V.V. ; DENDRINOS,G.J. und LOCKWOOD,D.H.

The insulin-carrying protein of normal human serum.
Diabetes 12 (1963) 144

RANDLE,P.J. und TAYLOR,K.W.

Insulin in protein fractions of serum from healthy people and from insulin-treated diabetics.
Lancet 1958(2),996

RANDLE und TAYLOR,K.W.

The insulin activity of protein fractions of normal sera.
J. Endocr. 17 (1958) 387

RAZAFIMAHALEO,E. und BOURRILLON,R.

Etudes sur la structure de l'α2-macroglobuline humaine. I.Préparation de l'α2-macroglobuline humaine.
Biochim. Biophys. Acta 154 (1968) 397

RIMON,A. ; SHAMASH,Y. und SHAPIRO,B.

The plasmin inhibitor of human plasma. IV.Its action on plasmin, trypsin, chymotrypsin and thrombin.
J. Biol. Chem. 241 (1966) 5102

RIVERA,J.V. ; TORO-GOYCO,E. und MATOS,M.L.

Molecular sieve in the study of plasma proteins.
Amer. J. Med. Sci. 149 (1965) 371

SAMAAN,N. ; FRASER,R. und DEMPSTER,W.J.

The"typical" and "atypical" forms of serum insulin.
Diabetes 12 (1963) 339

SANDERS,B.E. und OTT,Y.H.

ɣA-globulins and α2-macroglobulins. Characterization of ɣA- and α2-macroglobulin.
Can. J. Biochem. 46 (1968) 211

SCHERTENLEIB,F. und TULLER,E.F.
Paper electrophoresis of serum proteins in diabetic patients.
Diabetes 7 (1958) 46

SCHEURLEN,P.G.

Über Serumeiweißveränderungen beim Diabetes mellitus.
Klin. Wschr. 33 (1955) 198

SCHLAGETTER,K. und SCHWICK,G.

Immunchemischen Untersuchungen der Serumproteine von Schwangeren.
Z. Geburtshilfe Gynäkol. 157 (1961) 225

SCHÖNENBERGER,M. ; SCHMIDTBERGER,R. und SCHULTZE,H.E.

Über das α2-Makroglobulin.
Z. Naturforsch. 13b (1958) 761

SCHULTZE,H.E. ; GÖLLNER,I. ; HEIDE,K. ; SCHÖNENBERGER,M. und SCHWICK,G.

Zur Kenntnis der α-Globuline des menschlichen Normalserums.
Z. Naturforsch. 10b (1955) 463

SCHULTZE,H.E. ; HEIMBURGER,N. ; HEIDE,K. ; HAUPT,H. STÖRIKO,K. und SCHWICK,H.G.

Preparation and characterization of α1-trypsin inhibitor and α2-plasmin inhibitor of human serum.
Proc. 9th Congr. Europ. Soc. Haemat., Lisbon 1963
P.1315 (S.Karger, Basel/New York)

SCHULTZE,H.E. und SCHWICK,G.

Quantitative immunological determination of plasma proteins.
Clin. Chim Acta 4 (1959) 15

SCHUMACHER,G. und SCHLUMBERGER,H.D.
Über Veränderungen der Alpha-2-Globuline des Serums
Deutsch. Med. Wschr. 88(1963)645

SCHWICK,H.G. ; HEIMBURGER,N. und HAUPT,H.

Antiproteinasen des Humanserums
Z. Ges. Inn. Med. (Leipzig) 21 (1966) 193

SCOLARI,L. ; PICARD,J.J. und HEREMANS,J.F.

Quantitative determination of human α2M by means of immunoelectrophoresis in an antibody containing gel.
Clin. Chim. Acta 19 (1968) 25

SHAW,W.N. und SHUEY,E.W.

The presence of two forms of insulin in normal human serum.
Biochemistry 2 (1963) 286

SIREK,O.V. und SIREK,A.

Studies of insulin-J131 binding to plasma proteins of a HOUSSAY dog.
Acta Diabetologica Latina (Casa editrice "Il ponte", Milano) 2 (1965) 299

SKANSE,B.

The serum proteins in diabetes mellitus in relation to vascular coplications.
Acta Endocr. (Kobenhavn) 43 (1963) 3

STARZYNSKA,R.

Immunoelectrophoresis of protein binding J131-insulin.
(zitiert nach Chem. Abstr. 69(1968)1383p)
Pol. Arch. Med. Wewnet. 39 (1967) 793

STEIGERWALD,H. ; SPIELMANN,W. ; FRIES,H. und GREBE,S.F.

Neuere Untersuchungen über die Antigenwirkung des Insulins.
Klin. Wschr. 38 (1960) 973

STEINBUCH,M. ; BLATRIX,C. und JOSSO,F.

α2M as progressive antithrombin.
Nature 216 (1967) 500

STEINBUCH,M. ; BLATRIX,C. ; QUENTIN,N.M. ; PEJAUDIER,L. BERCHON,S. und MARTIN,V. (1968a)

The antiproteinase activity of α2-macroglobulin.
I.Antiplasmin and antitrypsin activitias.
(Zitiert nach Chem. Abstr, 69(1968)16424b)
Rev. Franc. Etud. Clin. Biol. 13 (1968) 142

STEINBUCH,M. ; BLATRIX,C. ; JOSSO,F. ; MARTIN,V. ; QUENTIN,M. und BEGUIN,S. (1968b)

The antiproteinase activity of α2-macroglobulin. II.Its role in progressive antithrombin states. (Zitiert nach Chem. Abstr. 69 (1968) 16425) Rev. Franc. Etud. Clin. Biol. 13 (1968) 179

STEINBUCHm,M. ; QUENTIN,M und PEJAUDIER,L.

Specific technique for the isolation of human α 2M. Nature 205 (1965) 1227

STEINES,W.J. und MEHL,J.W.

The elevation of alpha-2 macroglobulin and trypsin binding activity in nephrosis. J. Lab. Clin. Med. 67 (1966) 559

STEINKE,J. und SOELDNER,J.S.

In: B.S.LEIBEL und G.A.WRENSHALL eds. "On the nature and treatmant of diabetes" Amsterdam 1965, p. 212

STÖRIKO,K.

Normal values for 23 different human plasma proteins determined by single radial immunodiffusion. Blut 16 (1968) 200

SVEHAG,S.E. ; CHESEBRO,B. und BLOTH,B.

Ultrastructure of γM immunoglobulins and α-macroglobulin: electron microscopic study. Science 158 (1967) 933

SZCZEKLIK,A.

Trypsin-like activity of serum: Its origin and electrophoretic separation. Clin. Chim. Acta 13 (1969)219

TAYLOR,K.W.

The effect of human serumprotein fractions on the glucose uptake of the isolated rat diaphragm. Biochem. J. 69 (1958) 59p

TAYLOR,K.W. und RANDLE,P.J.

The effect of insulin antiserum on the insulin activity of serum and serum protein fractions. J. Clin. Endocr. 19 (1959) 221

TOMIZAWA,H.H. und HALSEY,Y.D.

Isolation of an insulin degrading enzyme from beef liver J. Biol. Chem. 234 (1959) 307

TORO-GOYCO,E. ; MALDONADO-MARTINEZ,M. und MATOS,M.

Insulin antibodies: Partial characterization by gel filtration.
Proc. Soc. Exp. Biol, Med. 122 (1966) 301

VARGAS,L. ; TAYLOR,K.W. und RANDLE,P.J.

Insulin and an inhibitor of glucose uptake in protein fractions of normal human plasma.
Biochem. J. 77 (1960) 43

VOGEL,R. ; TRAUTSCHOLD,I. und WERLE,E.
Natürliche Proteaseninhibitoren (Stuttgart 1966)

WALLENIUS,G. ; TRAUTMAN,R. ; KUNKEL,H.G. und FRANKLIN,E.C.

Ultracentrifugal studies of maior non-lipide electrophoretic components of normal human serum.
J. Biol. Chem. 225 (1957) 253

WEISS,A.W.

Normalwerte spezifischer Serumproteine im Kindes- und Erwachsenenalter.
Klin. Wschr. 45 (1965) 273

WILDING,P. ; ADHAM,N.F. ; MEHL,J.W. und HAVERBACK,B.J.

Alpha-2 macroglobulin levels in human serum
Nature 214 (1967) 1226

WILLEBRANDS,A.F.

Serum insulin and antiinsulin activity in diabetic acidosis.
Clin. Chim. Acta 5 (1960) 508

YALOW,R.S. und BERSON,S.A.

Immunoassay of endogenous plasma insulin in man.
J. Clin Invest. 39 (1960) 1157

ZAHND,P.G.R. und SCHEIDEGGER,J.

Role de la macroglobuline alpha-2 du sérum humaine dans la fixation in vitro de l'insulin bovine marquee à l'iodide J131.
Helv. Med. Acta. 30 (1963) 506

ZAHND,P.G.R. und SCHEIDEGGER,J.

Studies on the interrelationship between α2-macro-globulin and serum insulin-like activity. (Abstract)
5th Congr. Intern. Diabetes Fed.
Excerpta Medice, Intern. Congr. Ser. 74 (1964) 48

Mein Dank gilt vor allem Herrn Professor
Dr. E. Kallee, der mir das Thema überließ
und mir in der Isotopenabteilung der
Medizinischen Klinik großzügige
Arbeitsmöglichkeiten gewährte

Dank schulde ich auch Herrn Dr. W. Heinzel,
Pathologisches Institut der Universität Tübingen,
für Beratung und die Einweisung in seine
Proteinbestimmungsmethode

Herr Dozent Dr. Schneider, Blutbank an der
Chirurgischen Universitätsklinik Tübingen,
stellte mir dankenswerterweise ein Misch-
serum von 15 normalen Blutspendern zur
Verfügung

Lebenslauf

Am 1.Nov.1941 wurde ich, Gerhard Hanskarl Dürr, als jüngstes der fünf Kinder des Zahnarztes Dr. Hans-Hartmut Dürr und seiner Ehefrau Hanna, geb. v.Glinski, in Chemnitz/Sa. geboren.

Die Schule besuchte ich von 1947 bis 1960 in Münchberg/Ofr. Im Sommer 1960 bestand ich an der dortigen Oberrealschule das Abitur.

Vom WS 1960/61 bis zum SS1963 war ich in Tübingen für die Fächer Chemie und Medizin immatrikuliert. Ich bestand im Herbst 1961 das Vorphysikum und im Sommer 1963 das chemische Vordiplom.

Vom WS 1963/64 an setzte ich in Marburg das Medizinstudium fort. Im Frühjahr 1965 legte ich dort das Physikum ab.

Seit SS 1965 studierte ich, wieder in Tübingen, Biochemie und Medizin. Ich fertigte eine Diplomarbeit "Zur Frage einer Wechselwirkung zwischen Insulin und Enzymen" an und schloß im Herbst 1967 das Biochemiestudium mit dem Diplomexamen ab. Ein Zweitstudienstipendium der Stiftung Volkswagenwerk ermöglichte mir die Weiterführung des Medizinstudiums. Dieses beendigte ich im Winter 1969/70 mit dem Staatsexamen.